

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von
peripheren mononukleären Blutzellen des Schweins
durch Beta-Casomorphin-7 und selektive Opioidliganden

von Franziska Stetter
aus Darmstadt

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Meinem Opa,
in liebevoller Erinnerung

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATUR.....	3
2.1	Unterschied zwischen A1- und A2-Milch.....	3
2.1.1	Genetisch bedingte Varianz des Beta-Caseins.....	3
2.1.2	Entstehung von Beta-Casomorphin aus Milch	4
2.1.3	Beteiligung von Beta-Casomorphin-7 an Erkrankungen	5
2.2	Opioidrezeptoren.....	9
2.2.1	Aufbau und Funktion.....	9
2.2.2	Vorkommen von Opioidrezeptoren im Immunsystem	10
2.2.3	Wirkung von Opioiden auf immunologische Funktionen	13
2.3	Beta-Casomorphin	15
2.3.1	Opioide Eigenschaften von Beta-Casomorphin	15
2.3.2	Vorkommen in Muttermilch des Menschen	16
2.3.3	Quantifizierung in Lebensmitteln.....	17
2.3.4	Nachweis und Absorption im Gastrointestinaltrakt.....	19
2.3.5	Effekte von Beta-Casomorphin auf den Gastrointestinaltrakt	22
2.3.6	Auswirkungen von Beta-Casomorphin-7 auf das Immunsystem.....	24
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Probenmaterial	27
3.2	Aufbereitung der Blutproben und Isolierung der PBMC.....	28
3.2.1	Puffer und Lösungen.....	28
3.2.2	Gewinnung der Blutproben	28
3.2.3	Isolierung der PBMC.....	29
3.2.4	Manuelle Zellzählung	29
3.3	In vitro Verdau von Milch.....	30
3.3.1	Puffer und Lösungen.....	30
3.3.2	Gewinnung und Vorbereitung der Milchproben.....	31
3.3.3	Magenphase des Verdauprozesses.....	31
3.3.4	Dünndarmphase des Verdauprozesses.....	31
3.4	Lymphozytenproliferation	32
3.4.1	Puffer und Lösungen.....	32
3.4.2	Durchführung der Proliferationsassays	32
3.4.3	Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten	34
3.5	Präparation der Lymphozyten aus porcinen Peyer-Platten.....	35

3.5.1	Puffer und Lösungen.....	35
3.5.2	Gewinnung der Darmproben.....	36
3.5.3	Isolierung der Lymphozyten aus den Peyer-Platten.....	36
3.6	Anzucht von Darmzelllinien.....	37
3.6.1	Puffer und Lösungen.....	37
3.6.2	Kultur der Darmzelllinien	37
3.7	Molekularbiologischer Nachweis der Opioidrezeptoren.....	38
3.7.1	Puffer und Lösungen.....	38
3.7.2	RNA-Extraktion	39
3.7.3	cDNA-Synthese	41
3.7.4	Durchführung der PCR	42
3.8	Immunzytologie	44
3.8.1	Puffer und Lösungen.....	44
3.8.2	Immunzytologische Färbung	45
3.9	Durchflusszytometrie und Analyse.....	46
3.9.1	Puffer und Lösungen.....	46
3.9.2	Antikörper.....	47
3.9.3	Fluoreszenzfärbung von porcinen PBMC	47
3.9.4	Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer	48
3.9.5	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	48
3.10	Immunhistochemie.....	50
3.10.1	Puffer und Lösungen	50
3.10.2	Herstellung der Paraffinschnitte.....	51
3.10.3	Entparaffinieren der Paraffinschnitte.....	51
3.10.4	Immunhistochemische Färbung.....	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Veränderungen der Proliferationsrate porciner PBMC durch BCM-7 ...	53
4.1.1	Vergleich der Wirkung von A1- und A2-Milch.....	53
4.1.2	Wirkung von isoliertem BCM-7.....	54
4.1.3	Einfluss von Naloxon als Antagonist zu BCM-7	55
4.1.4	Wirkung von BCM-7 und Naloxon mit verschiedenen Lektinen	57
4.2	Effekt von selektiven Opioiden auf die Proliferation porciner PBMC ...	58
4.2.1	Vergleich der Wirkung selektiver Opioidliganden.....	58
4.2.2	Kombination von Naloxon mit Opioiden	59

4.3	Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation boviner PBMC	60
4.4	Molekularbiologischer Nachweis von Opioidrezeptoren	62
4.4.1	Opioidrezeptoren auf PBMC des Schweins	62
4.4.2	Opioidrezeptoren auf PBMC des Menschen	64
4.4.3	Opioidrezeptoren auf Lymphozyten aus porcinen Peyer-Platten	66
4.4.4	Opioidrezeptoren auf verschiedenen Darmzelllinien	67
4.5	Immunzytologischer Nachweis des μ-Opioidrezeptors	69
4.5.1	Nachweis auf porcinen PBMC	69
4.5.2	Nachweis auf bovinen PBMC	69
4.5.3	Nachweis auf equinen PBMC	70
4.6	Durchflusszytometrischer Nachweis des μ-Opioidrezeptors	71
4.7	Immunhistologischer Nachweis des μ-Opioidrezeptors	71
4.7.1	Positivkontrolle am porcinen Hippocampus	72
4.7.2	Nachweis des μ -Opioidrezeptors im Ileum des Schweins	73
4.7.3	Nachweis des μ -Opioidrezeptors im Lymphknoten des Schweins	75
5	DISKUSSION	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	SUMMARY	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	100
9	DANKSAGUNG	116

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
κ	kappa
μ	mu
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser (<i>lat.</i> Aqua bidestillata)
Aqua dest.	destilliertes Wasser (<i>lat.</i> Aqua destillata)
BanLec	Bananenlektin
BB	Bio-Breeding (Rattenmodell für Diabetes Typ-1)
BCM	Beta-Casomorphin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO_2	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
cpm	Einheit für die $[3\text{H}]$ -Aktivität (<i>engl.</i> Counts per minute)
DAMGO	D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol-Enkephalin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differentielle Interferenzkontrastmikroskopie
DMEM	Zellkulturmedium (<i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Desoxyribonucleic acid)
DOR	δ -Opioidrezeptor
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	<i>engl.</i> Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	Englisch
ENS	Enterisches Nervensystem
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl.</i> Fetal calf serum)
FSC	<i>engl.</i> Forward scatter
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gly	Glycin
G-Protein	mit Guanosindiphosphat gekoppeltes Protein
³ H	Tritium
H+L	schwere und leichte Kette (<i>engl.</i> Heavy and light chain)
HBSS	<i>engl.</i> Hank's balanced salt solution
HCl	Hydrogenchlorid
HDL	<i>engl.</i> High Density Lipoprotein
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HPLC/UV	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit UV-Detektion
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOR	κ-Opioidrezeptor
KS	Kolmogorov-Smirnov-Test
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LDL	<i>engl.</i> Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

M	Molar
mCi	Millicurie
MCP	<i>engl.</i> Monocyte chemotactic protein
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOR	μ-Opioidrezeptor
mRNA	<i>engl.</i> Messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NFAT	<i>engl.</i> Nuclear factor of activated T cells (Transkriptionsfaktor)
NF-κB	<i>engl.</i> Nuclear factor kappa B (Transkriptionsfaktor)
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumcarbonat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD	<i>engl.</i> Non-obese diabetic (Mausmodell für Diabetes-Typ 1)
NOR	Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptor
n.s.	nicht signifikant
OPR	Opioidrezeptor
p	Maß der statistischen Wahrscheinlichkeit
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>engl.</i> Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)

Abkürzungsverzeichnis

Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
Phe	Phenylalanin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pro	Prolin
PWM	Pokeweed mitogen
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>engl.</i> Relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid)
RPMI	Zellkulturmedium (<i>engl.</i> Roswell Park Memorial Institute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunden
SSC	<i>engl.</i> Side Scatter
T	Tween
T1D	Typ 1-Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Tris buffered saline)
TBS-T	TBS-Tween-Lösung
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Beta-Casomorphin 7 (BCM-7) ist ein opioides Peptid, das vorwiegend bei der enzymatischen Verdauung von Milch mit einem bestimmten Casein-Genotyp freigesetzt wird (Jinsmaa et al. 1999). Eine Punktmutation im Beta-Casein-Gen europäischer Rinderrassen führte zum Austausch einer einzelnen Aminosäure im Beta-Casein, welche zur erleichterten enzymatischen Spaltung des Milchproteins in der sogenannten A1-Milch führt (Ho et al. 2014). Bei der Verdauung der ursprünglichen A2-Milch entsteht das Peptid ebenfalls, jedoch in deutlich geringerem Maße (Asledottir et al. 2018). Einige epidemiologische Studien korrelierten den Konsum von A1-Beta-Casein positiv mit der Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 1 und der Mortalität an ischämischen Herzerkrankungen in verschiedenen Ländern (Elliott et al. 1999; McLachlan 2001; Laugesen et al. 2003). Aus diesen Studien entstand die Hypothese, dass BCM-7 aus A1-Beta-Casein ein Risiko für die Gesundheit des Verbrauchers darstellt (McLachlan 2001). Diese und weitere, in diesem Zusammenhang veröffentlichte Publikationen, wurden jedoch von mehreren Wissenschaftlern bewertet und als bislang nicht aussagekräftig genug befunden (Truswell 2005; Summer et al. 2020). Ein Bereich, in dem ebenfalls noch viel Forschungsbedarf besteht, ist der Effekt von Opioiden auf verschiedene immunologische Funktionen. Für Morphin wurde bereits in verschiedenen Studien eine Hemmung der Proliferation von Immunzellen bei Nagern und Menschen nachgewiesen (Bayer et al. 1990; Govitrapong et al. 1998; Nelson et al. 2000). Auch BCM-7 verursachte *in vitro* signifikante Veränderungen der Proliferation verschiedener Immunzellen des Menschen (Elitsur et al. 1991; Kayser et al. 1996; Fiedorowicz et al. 2011). Vergleichend zu diesen Ergebnissen beim Menschen untersuchten wir das Proliferationsverhalten von porcinen Immunzellen unter dem Einfluss von BCM-7, Morphin und anderen selektiven Opioidliganden. Das Schwein eignet sich zum einen in vielen Bereichen der Medizin als Tiermodell für den Menschen, da es viele Ähnlichkeiten in Physiologie, Anatomie sowie bei immunologischen Funktionen aufweist (Rothkötter 2009; Huang et al. 2014). Andererseits interessierte uns die Wirkung von BCM-7 auf das Schwein als Nutztier, da eine Beeinträchtigung des Immunsystems, vor allem in der Ferkelaufzucht, zu Wachstumseinbußen und höheren Tierverlusten führen kann. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir erstmals die Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) des Schweins. Zur Charakterisierung

des genauen Wirkmechanismus von BCM-7 testeten wir diese Zellen auf mRNA - und Proteinebene auf die Expression von Opioidrezeptoren. BCM-7 zeigte neben der Beeinflussung von immunologischen Funktionen auch Effekte auf den Gastrointestinaltrakt von Mäusen und Ratten, wie z.B. eine Hemmung der Motilität und eine vermehrte Schleimsekretion (Zoghbi et al. 2006; Dalziel et al. 2014). In zukünftigen Versuchen werden wir die Wirkung von BCM-7 auf gastrointestinale Funktionen des Schweins näher untersuchen. Als vorbereitenden Schritt führten wir bereits einen Nachweis des μ -Opioidrezeptors am Schweinedarm sowie speziell auf den Lymphozyten aus den Peyer-Platten des porcinen Ileums durch. Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit erstmals das Proliferationsverhalten porciner PBMC unter Einfluss von BCM-7 zu erforschen und festzustellen, ob die beobachteten Wirkungen über Opioidrezeptoren vermittelt werden. Dies diente der Einschätzung ob das Schwein sich auch in diesem immunologischen Zusammenhang als Tiermodell für den Menschen eignet. Unsere zukünftigen Untersuchungen werden weiter zur Aufklärung der spannenden Frage beitragen, ob das opioide Peptid aus der Milch ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellt oder nicht.

2 LITERATUR

2.1 Unterschied zwischen A1- und A2-Milch

2.1.1 Genetisch bedingte Varianz des Beta-Caseins

Kuhmilch besteht durchschnittlich zu etwa 3,36% aus Proteinen (Castillo-Umaña et al. 2020). Dazu gehören die Molkenproteine wie Beta-Laktoglobulin, Alpha-Laktalbumin, Laktoferrin und verschiedene Immunglobuline (Raimondo et al. 2019). Den weitaus größeren Anteil, mit rund 80% der Gesamtproteinmenge, machen jedoch die Caseine aus (Guantario et al. 2020). Man unterscheidet hier vier Arten, zwei verschiedene Alpha-Caseine (α S1- und α S2), sowie das Kappa- und Beta-Casein (Farrell et al. 2004). Letzteres macht mit circa 30% einen großen Anteil des Gesamtproteins in der Milch aus (Guantario et al. 2020). Das Beta-Casein-Gen trägt die Bezeichnung CSN2 und beim Hausrind sind bislang 12 verschiedene Varianten dieses Gens bekannt (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 und I), wobei A1 und A2 am häufigsten vorkommen (Gallinat et al. 2013). Die unterschiedlichen Varianten entstanden durch Mutationen im CSN2-Gen, die im Austausch verschiedener Aminosäuren im Beta-Casein resultierten (Kamiński et al. 2007). Sie lassen sich durch eine dieser Mutationen in zwei Hauptgruppen einteilen: A1- und A2-ähnlich (Ul-Haq et al. 2014b). Die erste Beschreibung dieser Mutation fand bereits 1969 statt, als noch nicht alle genetischen Varianten des Caseins bekannt waren (Groves 1969). Entscheidend verändert ist die Aminosäure an Position 67, die bei den A2-ähnlichen Varianten (A2, A3, D, E, H1, H2 und I) durch Prolin und bei den A1-ähnlichen (A1, B, C, F und G) durch Histidin gebildet wird (Farrell et al. 2004). Auf DNA-Ebene wird dies durch die von Cytosin in Adenin veränderte Base im zweiten Nukleotid des Codons 67 verursacht: CCT im A2-Protein wurde zu CAT im A1-Protein (Farrell et al. 2004). Das Codon CCT codiert für die Aminosäure Prolin, CAT hingegen für Histidin (Miluchová et al. 2014). Die ursprüngliche Form ist hierbei die A2-Form mit Prolin, die Histidin-enthaltenden Varianten entstanden durch die Mutation, die sich bereits vor 5.000-10.000 Jahren in den europäischen Milchviehrassen entwickelte (Ho et al. 2014). Kühe können entweder homozygot (A1/A1 bzw. A2/A2) oder heterozygot (A1/A2) für das Merkmal A1- oder A2-Beta-Casein sein, wobei die Heterozygotie dazu führt, dass beide Arten des Beta-Caseins in der Milch auftreten (Massella et al.

2017). Es wurden bereits einige Studien zur Verteilung der einzelnen Varianten in den verschiedenen Rinderrassen publiziert (Gustavsson et al. 2014; Miluchová et al. 2014; Sebastiani et al. 2020). Bei der in Europa dominierenden Milchviehrasse (Holstein Friesian), lagen die Frequenzen der häufigsten Genotypen von 1629 untersuchten Rindern in Italien bei ca. 37% für A2/A2, 10% für A1/A1 und 36% für den heterozygoten Genotyp A1/A2, wobei sich die restlichen Genotypen aus A3, B, C und I sowie deren Mischtypen zusammensetzten (Sebastiani et al. 2020). Andere Rassen, wie z.B. das Jersey-Rind wiesen mit rund 42 % A2/A2, 0,7 A1/A1, 9% A1A2 sowie 25% B/A2 eine andere Verteilung der häufigsten Genotypen auf (Gustavsson et al. 2014). Rinderrassen wie Gir und Guzerá, die genetisch noch näher mit dem Zebu verwandt sind, geben fast ausschließlich Milch mit A2-Beta-Casein (Rangel et al. 2017). Die Milch von Schafen, Ziegen, Büffeln, Schweinen, Pferden und Eseln sowie die Muttermilch des Menschen besitzt Prolin an Position 67 des Beta-Caseins und ähnelt demnach der A2-Milch des Rindes (Caroli et al. 2016). Neben der beim Rind beschriebenen Mutation wurden noch andere Polymorphismen des CSN2-Gens bei weiteren Tierarten nachgewiesen (Ceriotti et al. 2004; Kusza et al. 2016; Şuteu et al. 2019). Im ovinen Beta-Casein führte eine Mutation beispielsweise dazu, dass die Aminosäure Methionin an Position 183 durch Valin ersetzt wurde (Ceriotti et al. 2004). Bei Schweinen gibt es eine, bei den verschiedenen Rassen unterschiedlich häufig auftretende Punktmutation, die zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Glutamin an Position 201 im porcinen Casein führt (Şuteu et al. 2019).

2.1.2 Entstehung von Beta-Casomorphin aus Milch

Bereits vor über vierzig Jahren isolierte eine deutsche Arbeitsgruppe mittels Chloroform-Methanol-Extraktion aus *in vitro* verdautem bovinem Beta-Casein Peptide mit opioider Wirkung, die sie Beta-Casomorphine nannten (Brantl et al. 1979; Henschen et al. 1979). Sie fanden ein Heptapeptid, das Beta-Casomorphin-7 (BCM-7) und nach Verdau mit dem Enzym Carboxypeptidase Y auch das um zwei Aminosäuren kürzere Beta-Casomorphin 5 (BCM-5) (Henschen et al. 1979). Die opioide Aktivität der Peptide bestätigten die Wissenschaftler an einem Präparat des longitudinalen Muskels und des myenterischen Plexus aus dem Ileum des Meerschweinchens und zeigten außerdem, dass die Peptide relativ resistent gegen den enzymatischen Abbau, unter anderem durch Pronase, waren (Henschen et al.

1979). Die Casomorphine sind bereits in der Aminosäuresequenz des Caseins enthalten, so entspricht bovines BCM-7 beispielsweise den Aminosäuren 60-66 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) des Beta-Caseins (Henschen et al. 1979). Es sind vorwiegend die A1-ähnlichen Varianten des Beta-Caseins, aus denen BCM-7 durch enzymatische Verdauung entsteht, da die mutationsbedingte Aminosäure Histidin an Position 67 das Protein sehr viel anfälliger für die Spaltung durch Elastase macht (Jinsmaa et al. 1999). Dies bestätigte der Nachweis signifikant unterschiedlicher Mengen an BCM-7 in roher und *in vitro* verdauter A1- und A2-Milch in verschiedenen Publikationen (Cieślińska et al. 2012; Asledottir et al. 2018). In der Studie von Cieślińska et al. wurde die menschliche Verdauung durch eine Magenphase bei pH 1,8 mit Pepsin und eine Dünndarmphase bei alkalischem pH-Wert mit Trypsin und Elastase simuliert (Cieślińska et al. 2012). Asledottir et al. verwendeten hingegen gastrointestinale Verdauungssekrete von Testpersonen, in denen zuvor die enzymatische Aktivität für Pepsin und Trypsin bestimmt wurde (Asledottir et al. 2018). In unverdauter Milch ließ sich BCM-7 nur in sehr geringen Mengen von 1-2 ng/ml nachweisen, der Gehalt in verdauter Milch war mit rund 600 ng/ml (A1/A1) bzw. 50 ng/ml (A2/A2) dagegen wesentlich höher (Cieślińska et al. 2012). Diese beiden Studien zeigen, dass BCM-7 auch aus dem A2-Casein entstehen kann und nicht ausschließlich aus dem A1-Casein, wie es zuvor in einigen Publikationen beschrieben wurde (Jinsmaa et al. 1999; De Noni 2008; Ul Haq et al. 2015).

2.1.3 Beteiligung von Beta-Casomorphin-7 an Erkrankungen

Die positive Korrelation der Inzidenz von Typ 1-Diabetes mellitus (T1D) und der Mortalität an ischämischen Herzerkrankungen mit dem Konsum von A1-Beta-Casein, führte zur Hypothese, dass BCM-7 an der Entstehung dieser Erkrankungen mit verantwortlich sein könnte (Elliott et al. 1999; McLachlan 2001; Laugesen et al. 2003). Vor allem die potentielle Beteiligung von BCM-7 an der Pathogenese von Diabetes mellitus wurde eingehend untersucht. Schon bevor die A1-A2-Milch-Debatte aufkam, wurde in Fall-Kontrollstudien untersucht, ob die frühe Einführung von Kuhmilch in die Ernährung von Kleinkindern, das Risiko einer Erkrankung an T1D erhöht, sofern eine genetische Prädisposition vorlag (Kostraba et al. 1993). Die Wissenschaftler befragten 164 an T1D erkrankte Menschen zu ihrer Ernährung im Kindesalter und fanden heraus, dass die Gabe von Kuhmilch im Alter von unter drei

Monaten in genetisch stark prädisponierten Personen (bestimmt durch HLA-DQB1-Marker) zu einer erhöhten Inzidenz von T1D im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Kostraba et al. 1993). Seitdem wurden mehrere Studien mit größeren Probandenzahlen zu diesem Zusammenhang durchgeführt. Im Rahmen der „Diabetes Autoimmunity Study in the Young“ untersuchten Wissenschaftler Kinder auf drei Autoantikörper, die im Zusammenhang mit T1D auftreten und befragten deren Eltern zur Ernährung im Zeitraum der Geburt bis zum Alter von 15 Monaten (Lamb et al. 2015). Sie konnten zeigen, dass bei Kindern, die laut HLA-Marker-Bestimmung ein geringes bis moderates T1D-Risiko aufwiesen, eine vermehrte Aufnahme von Kuhmilch-Protein zu einer häufigeren Betazell-Autoimmunität führte (Lamb et al. 2015). Bei Kindern mit einem HLA-DR-Genotyp, der mit einem hohen Risiko für T1D assoziiert ist, konnten sie diesen Zusammenhang nicht nachweisen (Lamb et al. 2015). Eine aktuellere prospektive Kohortenstudie an 5545 genetisch prädisponierten Kindern zeigte, dass ein höherer Konsum von Milchprodukten, unabhängig von ihrer Prozessierung (Fermentierung, Hitzebehandlung) mit einem höheren Risiko für eine Autoimmunität gegen die Inselzellen des Pankreas assoziiert war (Koivusaari et al. 2020). Der Zusammenhang der Pathogenese von T1D mit dem Konsum von Milchprodukten wurde demnach auch in aktuelleren Publikationen gezeigt (Lamb et al. 2015; Koivusaari et al. 2020). Neben diesen Untersuchungen zum allgemeinen Risiko von Milchkonsum zeigten einige Studien eine positive Korrelation speziell zwischen der durchschnittlich konsumierten Menge an A1-Beta-Casein und der Inzidenz von T1D in verschiedenen Ländern auf (Elliott et al. 1999; Laugesen et al. 2003). Eine Reihe von Publikationen, die den Zusammenhang von A1-Casein in der Diät mit der Diabetes-Inzidenz an Tieren näher untersuchten, brachten hingegen Ergebnisse, die diese Hypothese in Frage stellten bzw. positive Wirkungen von BCM-7 bei Sekundär-Erkrankungen zeigten, die durch Diabetes verursacht werden (Beales et al. 2002; Han et al. 2013; Zhang et al. 2013). Fütterungsversuche mit Bio-Breeding-Ratten (BB-Ratten) und Non-Obese Diabetic-Mäusen (NOD-Mäuse), die beide etablierte Tiermodelle für T1D darstellen zeigten, dass eine Milch-freie Diät das Auftreten von T1D stärker förderte als eine Diät mit A1 und A2-Casein (Beales et al. 2002). Das A1-Beta-Casein wirkte nur bei den BB-Ratten in Kombination mit einer bestimmten Grunddiät signifikant stärker diabetogen als das A2-Protein, mit anderen Grunddiäten gab es dagegen keinen Unterschied (Beales et al. 2002). Eine andere Arbeitsgruppe fand heraus, dass in den

Generationen F0-F2 der verwendeten NOD-Mäuse kein Unterschied in der Diabetes-Inzidenz zwischen der Fütterung beider Caseintypen auftrat (Chia et al. 2018). In der F3-Generation jedoch verdoppelte sich die Inzidenz in der Gruppe mit A1-Diät im Vergleich zur A2-Gruppe, was nach Ansicht der Autoren für eine epigenetische Beeinflussung spricht (Chia et al. 2018). Einige Publikationen beschreiben außerdem eine antioxidative sowie antihyperglykämische Wirkung von BCM-7 bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes und damit einen protektiven Effekt bei diabetischen Sekundärerkrankungen wie der diabetischen Kardiomyopathie oder der Nephropathie (Yin et al. 2012; Han et al. 2013; Zhang et al. 2013). BCM-7 erhöhte die Konzentration von Insulin und senkte gleichzeitig die Konzentration von Glukagon im Plasma diabetischer Ratten, was letztendlich zur Verringerung der Hyperglykämie und der daraus resultierenden Schäden führte (Zhang et al. 2013).

Ähnlich widersprüchlich und rar ist die Datenlage zur Hypothese, dass BCM-7 Atherosklerose verursacht und damit in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen stehen könnte. Zunächst wurde in zwei Korrelationsstudien gezeigt, dass der durchschnittliche Konsum von A1-Beta-Casein in verschiedenen Ländern positiv mit der Mortalitätsrate an ischämischen Herzkrankheiten korreliert (McLachlan 2001; Laugesen et al. 2003). Der A1-Casein-Konsum pro Kopf wurde anhand statistischer Daten aus dem durchschnittlichen Konsum von Kuhmilchprotein des jeweiligen Landes und der Verteilung der einzelnen Rinderrassen sowie deren geschätzter Allelhäufigkeit für A1-Casein berechnet (Laugesen et al. 2003). Den A1-Casein-Konsum pro Kopf korrelierten die Wissenschaftler für die Jahre 1980-1995 positiv mit Daten der Weltgesundheitsorganisation zur Mortalitätsrate für ischämische Herzkrankheiten, jeweils fünf Jahre nach dem jeweiligen Zeitpunkt für den sie den A1-Konsum pro Kopf berechnet hatten (Laugesen et al. 2003). Ein Fütterungsversuch mit Kaninchen zeigte, dass eine Diät mit A1-Beta-Casein, im Vergleich zur A2-Beta-Casein-Diät, zu einem signifikant höheren Serum-Cholesterin und LDL:HDL-Quotienten (Risikomarker für Atherosklerose) sowie zur signifikanten Vermehrung von fettigen Ablagerungen in der Aorta nach einer künstlichen Verletzung mittels Ballon-Katheter führte (Tailford et al. 2003). In einer klinischen Doppelblindstudie mit 15 Teilnehmern, aus der Risikogruppe für koronare Herzerkrankungen, zeigte der je 12-wöchige Konsum von einer definierten Menge A1 bzw. A2-Casein keine Unterschiede in Werten wie Serum-Cholesterin, LDL:HDL-Quotient, Blutdruck oder in Funktionsuntersuchungen an den Gefäßen (Chin-Dusting

et al. 2006). In einer Studie mit 62 gesunden Menschen konnte ebenfalls kein Unterschied im Plasma-Cholesterin, -HDL, -LDL oder -Triglycerid zwischen A1/A2- und reinem A2-Casein-Konsum festgestellt werden (Venn et al. 2006). Das brachte die Wissenschaftler zu der Feststellung, dass der Konsum von A1-Casein keinen Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen darstellt (Chin-Dusting et al. 2006; Venn et al. 2006). Die Auswertung größerer Kohortenstudien brachte sogar die Erkenntnis, dass Milchkonsum in diesem Zusammenhang eher eine leicht präventive Wirkung hat (Elwood et al. 2004a; Elwood et al. 2004b; Elwood et al. 2005).

Eine weitere Erkrankung, die mit BCM-7 in Verbindung gebracht wird, ist Autismus. Man fand heraus, dass Säuglinge, die ausschließlich Kuhmilch-basierte Säuglingsmilchnahrung erhielten, mehr BCM-7 im Plasma aufwiesen und einen erhöhten Muskeltonus sowie eine verzögerte psychomotorische Entwicklung im Vergleich zur gestillten Kontrollgruppe zeigten (Kost et al. 2009). Eine andere Arbeitsgruppe stellte fest, dass autistische Kinder signifikant größere Mengen an BCM-7 im Urin ausschieden als gesunde Kinder und dass der Schweregrad der Erkrankung mit der gefundenen Menge an BCM-7 positiv korrelierte (Sokolov et al. 2014). Auch im Serum betroffener Kinder fand man signifikant höhere BCM-7-Werte als bei gesunden Kindern (Jarmołowska et al. 2019). Hingegen gibt es aber auch mehrere Publikationen, die BCM-7 im Urin autistischer Kinder, trotz Anwendung verschiedener Methoden (LC-MS/MS, ELISA, HPLC) nicht nachweisen konnten (Hunter et al. 2003; Dettmer et al. 2007; Cass et al. 2008). Eine klinische Studie zeigte, dass eine casein- und glutenfreie Ernährung bei autistischen Kindern eine signifikante Verbesserung der Symptome bewirkte (El-Rashidy et al. 2017). Allerdings gab es ebenso Studien, die dies nicht bestätigen konnten (Hyman et al. 2016) und die zusätzlich keinen Zusammenhang zwischen BCM-7 im Urin und dem Schweregrad der Autismus-Symptome finden konnten (González-Domenech et al. 2020). Einige Publikationen brachten BCM-7 auch mit der Schlafapnoe als Ursache für den plötzlichen Kindstod in Zusammenhang (Sun et al. 2003; Wasilewska et al. 2011). Die Theorie hinter dieser Hypothese lautet, dass BCM-7 aufgrund der noch recht durchlässigen Darmschranke bei Säuglingen leicht übers Blut und die noch unreife Bluthirnschranke in den Hirnstamm gelangen und eine lebensbedrohliche Atemdepression verursachen könnte (Sun et al. 2003). Tatsächlich fand man bei einigen Kleinkindern nach einem akuten lebensbedrohlichen Ereignis durch Apnoe einen erhöhten Gehalt an BCM-7 im Serum im Vergleich zu gesunden Kindern im

gleichen Alter (Wasilewska et al. 2011). Gleichzeitig fanden die Wissenschaftler eine verringerte Aktivität des Enzyms Dipeptidylpeptidase-4 (DPPIV) im Serum aller betroffenen Kinder, die für die erhöhten BCM-7-Gehalte durch verringerten Abbau des Peptids verantwortlich sein könnte (Wasilewska et al. 2011). Weitere Studien zu diesem Zusammenhang wurden unseres Wissens bislang nicht veröffentlicht (Stand der Pubmed-Literaturrecherche: 19.01.2021). In einer umfassenden Rezension bewerteten Summer et al. Studien zu BCM-7 und den assoziierten Erkrankungen und kamen zu dem Schluss, dass es lediglich Hinweise darauf gibt, dass BCM-7 die Symptome von Autismus verschlechtert, dass jedoch noch weitere Studien notwendig sind, um den endgültigen Beweis zu erbringen (Summer et al. 2020). Aufgrund der begrenzten Anzahl an Studien und der teils gegensätzlichen Ergebnisse entschieden sie, dass die Datenlage bislang nicht ausreicht, um eine eindeutige Empfehlung für bzw. gegen den Konsum von A1-Beta-Casein zu geben oder sogar die Strategien der Rinderzucht zu ändern (Summer et al. 2020).

2.2 Opioidrezeptoren

2.2.1 Aufbau und Funktion

Da BCM vorwiegend an den μ -Opioidrezeptoren wirkt (Koch et al. 1985; Zoghbi et al. 2006), beschäftigt sich dieses Kapitel mit Aufbau, Funktion und Vorkommen dieser Rezeptoren in Geweben und auf Immunzellen, sowie mit der allgemeinen Wirkung von Opioiden auf immunologische Funktionen. Opioidrezeptoren gehören zur Familie der mit Guanosintriphosphat-bindenden Proteine (G-Proteine) gekoppelten Rezeptoren und werden in die drei Hauptklassen μ -, κ - und δ -Rezeptoren eingeteilt (Dhawan et al. 1996; Wu et al. 2012). Diese Benennung erfolgte anhand ihrer typischen Liganden oder ihrer Verteilung im Gewebe: δ steht für *Vas deferens*, μ für Morphin und κ für Ketocyclazocine (Granier et al. 2012). Neben diesen existiert noch der Nociceptin/Orphanin FQ Rezeptor (NOR), der zwar eine ähnliche Sequenz aufweist, dessen pharmakologische Eigenschaften sich jedoch stark von denen der klassischen Rezeptoren unterscheiden (Mollereau et al. 1994; Thompson et al. 2012). Die Opioidrezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Anteil (N-Terminus), sieben transmembranären Domänen und einem intrazellulären C-Terminus (Listos et al. 2019). An den N-Terminus können Opioidliganden binden,

während an die intrazellulären Domänen das G-Protein gekoppelt ist, welches aus drei Untereinheiten besteht (Koehl et al. 2018). Die größere α -Untereinheit bindet im inaktivierten Zustand Guanosindiphosphat (GDP) sowie die kleinere, zusammenhängende $\beta\gamma$ -Einheit (Koehl et al. 2018). Bindet nun ein passender Ligand an den Opioidrezeptor, dissoziiert GDP von der α -Untereinheit und wird durch Guanosintriphosphat ersetzt (Listos et al. 2019). Daraufhin trennen sich die beiden Untereinheiten und können nun unabhängig voneinander verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege beeinflussen (Listos et al. 2019). Die natürlichen Liganden der Opioidrezeptoren sind endogene Peptide wie Endorphine (μ), Enkephaline (δ) und Dynorphine (κ) (Granier et al. 2012). Die meisten medizinisch genutzten Opioide sind Liganden des μ -Rezeptors wie Morphin, Fentanyl oder Oxycodon (Grinnell et al. 2020). Zu den typischen Mechanismen der Opioidrezeptoraktivierung gehört die Regulation der Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Adenylylcyclasen (Sharma et al. 1977; Chakrabarti et al. 2016). Der μ -Opioidrezeptor ist fast ausschließlich mit einem inhibitorischen G-Protein gekoppelt, das die Aktivität der Adenylylcyclasen hemmt und somit den Gehalt an intrazellulärem cAMP senkt (Koehl et al. 2018). Dieses wichtige Second-Messenger-Molekül aktiviert vorwiegend Proteinkinasen, die in der Lage sind Proteine zu phosphorylieren (Knape et al. 2020). Die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins kann außerdem direkt inhibitorisch auf spannungsabhängige Calciumkanäle wirken und damit die Übertragung der Neurotransmitter an Nervenzellen hemmen (Agler et al. 2005). Außerdem werden durch die Aktivierung von Opioidrezeptoren Kaliumkanäle aktiviert und durch die daraus resultierende Hyperpolarisation die Entstehung eines Aktionspotenzials verhindert (Fox et al. 2017). Die Hauptwirkung der Opioide ist eine potente Analgesie, aber sie verursachen auch diverse zentrale und gastrointestinale Nebenwirkungen wie Sedierung, Atemdepression, Übelkeit und Verstopfung (Spahn et al. 2018).

2.2.2 Vorkommen von Opioidrezeptoren im Immunsystem

Opioidrezeptoren sind vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitet (Kantonen et al. 2020). Die höchste Dichte an μ -Rezeptoren weisen unter anderem die Amygdala, der Thalamus, der orbitofrontale Cortex und der Nucleus accumbens auf (Kantonen et al. 2020). Seit den frühen 1980er Jahren wurde die Expression von

Opioidrezeptoren auch auf Immunzellen mit verschiedenen Methoden nachgewiesen, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen (Machelska et al. 2020). Die Opioidrezeptoren auf Immunzellen haben ähnliche pharmakologische und biochemische Eigenschaften und werden von denselben Genen codiert, wie die neuronalen Rezeptoren (Celik et al. 2016). Mittels Radioliganden-Bindungsassay mit Dihydromorphin und mit dem Opioidantagonisten Naloxon wurde der μ -Opioidrezeptor (MOR) auf humanen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten nachgewiesen (Lopker et al. 1980; Mehrishi et al. 1983). Durch eine reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurde in humanen peripheren Blutleukozyten zunächst nur die mRNA für den δ -Opioidrezeptor (DOR) gefunden (Chuang et al. 1994), etwas später auch die für den κ - und μ -Rezeptor (KOR und MOR) (Chuang et al. 1995a; Chuang et al. 1995b). Gaveriaux et al. fanden hingegen mit dieser Methode nur die mRNA für den KOR in PBMC des Menschen (Gaveriaux et al. 1995). Mittels Northern Blot konnte die Expression geringer Mengen des DOR und des KOR auf den PBMC nachgewiesen werden, der MOR war hingegen nicht detektierbar (Wick et al. 1996). Mittels quantitativer RT-PCR konnte bei Mäusen sowohl in peripheren Blutlymphozyten, als auch in Lymphozyten aus Nervengewebe die mRNA für alle drei Rezeptortypen nachgewiesen werden (Celik et al. 2016). Eine aktuelle Studie brachte das Ergebnis, dass der MOR in verschiedenen T-Zellsubpopulationen (CD4+, CD8+), Monozyten und NK-Zellen des Menschen exprimiert werden, in B-Zellen jedoch nicht (Karagiannis et al. 2020). Die beiden anderen klassischen Rezeptortypen DOR und KOR waren in den untersuchten humanen Zellen schwach ausgeprägt oder nicht detektierbar, wohingegen der Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptor (NOR) in allen Zellen vorhanden war (Karagiannis et al. 2020). In zwei der bislang veröffentlichten Studien konnte dagegen keiner der klassischen Rezeptortypen in humanen PBMC nachgewiesen werden, obwohl verschiedene Methoden (Radioliganden-Bindungsassay, Durchflusszytometrie, PCR) eingesetzt wurden (Williams et al. 2007; Al-Hashimi et al. 2016). Man fand nur die mRNA, die für den Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptor codiert, der nicht zu den klassischen Opioidrezeptoren gezählt wird, aber dennoch Auswirkungen auf immunologische Funktionen hat (Williams et al. 2007). Auch klinische Studien lieferten teils kontroverse Ergebnisse zur Ausprägung von Opioidrezeptoren in Immunzellen (Campana et al. 2010; Toskulkao et al. 2010). Eine Arbeitsgruppe zeigte, dass periphere Lymphozyten des Menschen den MOR nicht

nur ausprägen, sondern dass die chronische Behandlung mit Morphin die Expression der Rezeptorgene auch signifikant erhöht (Campana et al. 2010). Eine andere beschrieb wiederum die Verminderung der μ - und δ -Rezeptoren auf Lymphozyten von früheren Heroin-abhängigen unter chronischer Methadon-Ersatztherapie (Toskulkao et al. 2010). Auch funktionelle Untersuchungen zeigten Auswirkungen auf das Vorhandensein von Opioidrezeptoren auf Immunzellen (McCarthy et al. 2001; Zhang et al. 2012). An Thymozyten der Maus konnte beispielsweise mittels Chemotaxis-Assay und Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass hauptsächlich unreife T-Zellen den MOR ausprägen und positiv chemotaktisch auf μ -Opioidliganden reagieren (McCarthy et al. 2001). Somit ist ein Einfluss von Opioiden, wie z.B. Endorphinen, auf die T-Zell-Differenzierung denkbar (McCarthy et al. 2001). Die Expression des MOR wurde durch Zytokine wie Interferon Gamma (IFN γ) und die Interleukine IL-1 β und IL-2, die eine Rolle in der T-Zell-Differenzierung spielen, signifikant gesteigert und durch TNF- α und IL-7 gehemmt (Zhang et al. 2012). In der Jurkat-Zelllinie (T-Zellen) und der Raji-Zelllinie (B-Zellen) des Menschen konnte die mRNA für den MOR erst nach Stimulation mit IL-4 und TNF- α nachgewiesen werden (Börner et al. 2007). Zytokine beeinflussen demnach die Ausprägung von Opioidrezeptoren auf Immunzellen (Börner et al. 2007; Zhang et al. 2012). Zur Expression des MOR in porcinen Immunzellen wurden, nach unserem Kenntnisstand, bislang nur Publikationen einer Arbeitsgruppe veröffentlicht. Die Experimente dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass isolierte porcine PBMC, Thymozyten und auch Lymphozyten aus den Peyer-Platten keine mRNA für den MOR enthalten, die für den KOR und den DOR konnten sie allerdings in den Zellen nachweisen (Pampusch et al. 1998). Die umliegenden Gewebe wie der Thymus und die Peyer Platten im Ileum wiesen die mRNA für alle drei Rezeptortypen auf, wohingegen die peripheren Lymphknoten des Schweins nur den DOR und KOR enthielten (Pampusch et al. 1998). Im Ileum des Schweins fand man den MOR mittels Radioliganden-Bindungsassay in basalen Zotten- und Kryptenzellen des Epithels (Quito et al. 1991). Auch der DOR konnte in der ilealen Mukosa mithilfe von PCR und immunhistochemischen Methoden, vor allem im myenterischen und submukösen Plexus des enterischen Nervensystems (ENS), aber auch in den Lymphfollikeln der Peyer-Platten nachgewiesen werden (Brown et al. 1998). Genauere Untersuchungen einzelner Neuronen im ENS des Schweins zeigten, dass manche Subtypen den DOR und den KOR koexprimieren, andere wiesen wiederum nur einen der Typen auf

(Kulkarni-Narla et al. 2001). Im Schweinedarm sind es demnach hauptsächlich die neuronalen Strukturen des ENS, die Opioidrezeptoren ausprägen, aber auch im immunologischen Gewebe wie den Peyer Platten konnten diese nachgewiesen werden (Brown et al. 1998; Pampusch et al. 1998).

2.2.3 Wirkung von Opioiden auf immunologische Funktionen

Es gibt zwei Hauptmechanismen, über die Opioide auf die Funktion von Immunzellen einwirken können: direkt über Opioidrezeptoren auf den jeweiligen Zellen oder indirekt über die Aktivierung von Opioidrezeptoren im ZNS (Kosciuczuk et al. 2020). Der letztgenannte Mechanismus beruht zum einen auf der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, die über eine vermehrte Freisetzung von Hormonen aus dem Hypothalamus und der Hypophyse letztendlich zur stärkeren Produktion von Glukocorticoiden in der Nebennierenrinde führt (Kosciuczuk et al. 2020). Des Weiteren bewirken Opioide über das sympathische Nervensystem eine Freisetzung von Katecholaminen wie Adrenalin im ZNS und im Nebennierenmark, die dann wiederum Einfluss auf immunologische Funktionen nehmen (Odunayo et al. 2010). Den ersten Hinweis darauf, dass Opioide neben dem ZNS auch das Immunsystem beeinflussen können, brachten *in vitro* Untersuchungen an humanen T-Lymphozyten, die unter Zugabe von Morphin Naloxon-reversibel signifikant weniger Rosetten um Schaferythrozyten bildeten (Wybran et al. 1979). Danach folgten verschiedene Studien an isolierten Zellen nach Verabreichung von Opioiden *in vitro* und *in vivo* zur genaueren Untersuchung dieses Zusammenhangs (Bryant et al. 1988; Bian et al. 1995; Houghtling et al. 2000). Nach subkutaner Verabreichung von Morphin-Pellets an Mäuse konnte nach 48-72 Stunden eine deutliche Atrophie des Thymus und der Milz, sowie eine gehemmte Proliferation der zugehörigen Lymphozyten beobachtet werden (Bryant et al. 1988). Auch die T-Zellen aus dem Blut von Ratten reagierten auf die intrazerebroventrikuläre Verabreichung von Morphin mit einer verringerten Proliferationsrate nach Concanavalin A (ConA)-Stimulation (Houghtling et al. 2000). Die *in vitro* Zugabe von Morphin veränderte die Proliferation reifer muriner T-Zellen konzentrationsabhängig (Bian et al. 1995). Niedrige Konzentrationen Morphin bis 1 μ M führten zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation, eine höhere Konzentration von 1 mM Morphin verursachte hingegen eine Hemmung (Bian et al. 1995). Andere μ -selektive Opioide, die häufig als

Schmerzmittel eingesetzt werden wie Fentanyl, Methadon oder Buprenorphin haben unterschiedliche Wirkung auf Immunzellen (Franchi et al. 2019). So bewirkte Fentanyl nach 24 Stunden bereits eine signifikante Abnahme der Proliferation von murinen Splenozyten sowie der Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Buprenorphin hatte hingegen weder akut noch chronisch angewendet einen Effekt, obwohl beide Stoffe ein ähnliches analgetisches Profil besitzen (Martucci et al. 2004). Neben den μ -selektiven Opioiden, können auch solche, die über δ - oder κ -Rezeptoren wirken die Funktion von Immunzellen beeinflussen (Taub et al. 1991; Shahabi et al. 1995; Rahim et al. 2001). So bewirkte das synthetische Opioid U69,593 an κ -Rezeptoren eine dosisabhängige Inhibition der Antikörper-Produktion von murinen B-Zellen *in vitro* (Taub et al. 1991). Der δ -selektive Ligand Deltorphin I zeigte eine antiproliferative Wirkung auf murine T-Zellen (Shahabi et al. 1995). Nelson et al. konnten nach intrazerebroventrikulärer Verabreichung von U69,593 sowie δ -selektiven Agonisten an Ratten allerdings keine Wirkung auf die Aktivität der NK-Zellen oder die T-Zellproliferation feststellen, D-Ala²-N-MePhe⁴-Gly-ol-Enkephalin (DAMGO) als μ -selektiver Ligand hemmte beide Parameter jedoch signifikant (Nelson et al. 2000). In einer weiteren vergleichenden Studie applizierten Forscher Mäusen über subkutan platzierte osmotische Minipumpen jeweils Morphin, U50,488H (κ -selektiv) oder Deltorphin II (δ -selektiv) und untersuchten die Wirkung auf die Antikörperbildung der Splenozyten (Rahim et al. 2001). 48 Stunden nach der Implantation wurde im Plaque-Assay gezeigt, dass alle drei Substanzen eine dosisabhängige Inhibition der Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten hervorriefen (Rahim et al. 2001). Auf die Zytotoxizität humaner NK-Zellen wirkten Morphin, Methadon, Buprenorphin (μ -Liganden) sowie U-50488 (κ -Ligand) signifikant hemmend, während δ -Liganden keine Auswirkung hatten (Maher et al. 2019). Die verschiedenen opioiden Stoffe zeigen demnach unterschiedliche Wirkungen auf Immunzellen verschiedener Tierarten und die genauen zugrundeliegenden Mechanismen bedürfen weiterer Forschung (Franchi et al. 2019). Obgleich viele Publikationen eine Hemmung der verschiedenen immunologischen Funktionen beschreiben, kann man nicht generalisieren, dass die Immunsuppression eine Nebenwirkung aller Opioiden ist (Franchi et al. 2019). Um einen Beitrag zur weiteren Erforschung der Opioidwirkungen auf das Immunsystem zu leisten, untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit den Effekt von verschiedenen selektiven Opioidliganden auf die Proliferation porciner PBMC.

2.3 Beta-Casomorphin

2.3.1 Opioide Eigenschaften von Beta-Casomorphin

Beta-Casomorphine wurden 1979 zum ersten Mal aus bovinem Casein isoliert und als opioide Peptide beschrieben (Brantl et al. 1979). Man untersuchte die Wirkung von BCM-7, sowie die der Abkömmlinge BCM-6, -5, -4 und -3 an isolierten Organpräparaten (*Vas deferens* der Maus und Ileum des Meerschweinchens) und mittels Radioliganden-Bindungsassay im Vergleich zu bekannten Opioiden (Brantl et al. 1981). Es zeigte sich, dass BCM-5 am potentesten hemmend auf die elektrisch stimulierten Kontraktionen der verschiedenen Organpräparate wirkte und die höchste Affinität zu Opioidrezeptoren aufwies (Brantl et al. 1981). Die hemmende Wirkung von BCM-7 auf die Organpräparate war dagegen am geringsten von allen untersuchten Casomorphinen (Brantl et al. 1981). An einem vollständigen isolierten Rattenkolon konnte die hemmende Wirkung von BCM-5 auch auf spontane Kontraktionen des Darms nachgewiesen werden (Dalziel et al. 2014). Dass Beta-Casomorphine vorwiegend an μ -Opioidrezeptoren binden, zeigte die starke Hemmung der Kontraktionen am Ileum des Meerschweinchens, das hauptsächlich diesen Rezeptortyp enthält, sowie die Ähnlichkeit zum Wirkprofil des typischen μ -Liganden Normorphin (Brantl et al. 1981). Spezifischere Radioliganden-Bindungsassays bestätigten die höchste Affinität zu μ -, eine weniger starke zu δ - und die schwächste zu κ -Opioidrezeptoren (Koch et al. 1985). Die vorrangige Wirkung von Opioiden ist eine zentrale Analgesie, welche auch für Beta-Casomorphine in Tierversuchen nachgewiesen wurde (Brantl et al. 1982; Rüthrich et al. 1992). BCM-5 zeigte bei Ratten im Vokalisationstest (Lautäußerung aufgrund zunehmender Stromimpulse am Schwanz) die stärkste antinozizeptive Wirkung nach 15 min, die Analgesie hielt für ca. 60 min an und war durch den Opioidantagonisten Naloxon komplett aufhebbar (Brantl et al. 1982). Strukturelle Veränderungen im BCM-5-Molekül wie der Austausch einzelner L-Aminosäuren durch ihr D-Analogon und die Zyklisierung des Peptids verstärkten die analgetische Wirkung im gleichen Test um das 50-fache im Vergleich zum linearen Molekül (Rüthrich et al. 1992). Eine problematische Eigenschaft von Opioiden ist ihr Potenzial zur Verursachung einer Toleranz, die oft zur Abhängigkeit führt (Hsu et al. 2019). Daher wurde das Abhängigkeitspotenzial von BCM-7 im Vergleich zu Morphin bei Ratten im

konditionierten Platzpräferenztest untersucht (Reid et al. 1994). Es stellte sich heraus, dass BCM-7 im Gegensatz zu Morphin keine belohnende Wirkung auf das Gehirn hatte, welche in diesem Test zur Präferenz des Ortes führte, wo der Stoff wiederholt verabreicht wurde (Reid et al. 1994). Nach unserem Kenntnisstand ist dies jedoch die einzige Studie, die bisher zum Abhängigkeitspotenzial von BCM-7 durchgeführt wurde (Stand der Pubmed-Literaturrecherche: 22.01.2021). Die opioiden Wirkungen wie Analgesie und Hemmung der Darmmotilität sind bei Beta-Casomorphinen demnach durchaus ausgeprägt (Brantl et al. 1982; Dalziel et al. 2014), es führt jedoch nicht zur Abhängigkeit (Reid et al. 1994).

2.3.2 Vorkommen in Muttermilch des Menschen

Nachdem in der Kuhmilch Peptide mit opioider Wirkung gefunden wurden, wurde auch Muttermilch auf das Vorhandensein ähnlicher Peptide untersucht (Brantl 1984). Humanes Beta-Casein enthält in seiner Sequenz ein dem bovinen BCM-7 ähnliches Peptid (Position 51-57), das jedoch zwei abweichende Aminosäuren (Tyr-Pro-Phe-**Val-Glu**-Pro-Ile) im Vergleich zum bovinen Peptid (Aminosäuren 60-66 des Caseins, Tyr-Pro-Phe-**Pro-Gly**-Pro-Ile) aufweist (Brantl 1984). Die opioide Wirkung der daraus entstehenden Varianten BCM-4 und -5 war im isolierten Meerschweinchen-Ileum deutlich schwächer als die der bovinen Varianten (Brantl 1984). Vorstufen zu humanem BCM-8 wurden im Plasma von Frauen vor und nach der Geburt gefunden, im Plasma von Männern und nicht schwangeren Frauen waren sie jedoch nicht auffindbar (Koch et al. 1988). Mittels HPLC/UV-Untersuchungen fand man heraus, dass der BCM-Gehalt im Kolostrum von Frauen signifikant höher war als in der später folgenden Milch (Jarmołowska et al. 2007). Frauen mit einer Lebensmittelallergie bzw. Asthma zeigten dagegen gleich bleibende Gehalte an BCM-5 und -7 in Kolostrum und Folgemilch, die generell sehr viel niedriger waren als die der Kontrollgruppe (Sidor et al. 2008). Die Muttermilch gehört zum A2-ähnlichen Typ mit Prolin an Position 67 im Beta-Casein (Caroli et al. 2016), weshalb die Entstehung von relevanten Mengen BCM-7, im Vergleich zu boviner Milch vom A1-Typ, eher unwahrscheinlich ist. Analog dazu zeigten aktuellere LC-MS/MS-Analysen, dass Muttermilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Geburt BCM-8, -9, -10 und -11, sowie deren Vorstufen enthielt, jedoch kein BCM-7 (Enjapoori et al. 2019).

2.3.3 Quantifizierung in Lebensmitteln

Dem Nachweis und der Quantifizierung von BCM-7 in Milch und Milchprodukten wie Käse und Joghurt wurde in den letzten Jahren viel Bedeutung beigemessen. A1/A1-, A2/A2- sowie A1/A2-Milch wurden roh, und in verschiedenen Prozessierungsstufen mittels ELISA untersucht, um den Einfluss der verschiedenen Behandlungsmethoden und des Beta-Casein-Typs auf den BCM-7-Gehalt zu charakterisieren (Cieślińska et al. 2012). Das Ergebnis dieser Studie ist in nachfolgender Tabelle zusammenfassend dargestellt:

Behandlung der Milch	Verdauung mit Pepsin, Trypsin und Elastase	BCM-7-Gehalt in ng/ml		
		A1/A1	A1/A2	A2/A2
Keine	nein	2,5	1,9	1,35
	ja	458,5	257	37,5
Pulverisierung	nein	2,7	0,8	0,9
	ja	324,8	152,5	86,8
Pasteurisierung	nein	3,3	6,1	3,6
	ja	346,9	207,1	31,7
Sterilisierung	nein	2,9	7,4	5,4
	ja	240,7	154,1	31,1

Tabelle 2.1: BCM-7-Gehalte in Milch unterschiedlichen Beta-Casein-Genotyps

Die Tabelle zeigt das zusammengefasste Ergebnis der Studie von Cieślińska et. al (2012) zur Bestimmung des BCM-7-Gehaltes in Milch mit unterschiedlichem Beta-Casein-Genotyp (A1/A1, A1/A2 und A2/A2). Die Milch wurde jeweils roh und mit folgender Vorbehandlung untersucht: Pulverisierung durch Trocknung, Pasteurisierung (95°C, 20 min) und Sterilisierung (117°C, 5 min). Zusätzlich wurde jeder Ansatz mittels Pepsin, Trypsin und Elastase in vitro verdaut.

Unabhängig von der Vorbehandlung, war in verdauter A1/A1-Milch der höchste Gehalt an BCM-7 nachweisbar (Cieślińska et al. 2012). In A1/A2 Milch war er um den Faktor 1,5 - 2 verringert und in der A2/A2-Milch war der Gehalt am niedrigsten (Cieślińska et al. 2012). In roher Milch war BCM-7 ebenfalls nachweisbar, der Gehalt war jedoch deutlich geringer als in verdauter Milch, unabhängig davon, wie sie zuvor behandelt wurde (Cieślińska et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe fand mittels LC-MS/MS-Analysen in unverdauten, rohen Milchproben unbestimmten Casein-Genotyps BCM-7 Gehalte von 0,76 bis 8,41 ng/g (Nguyen et al. 2019) und in

pasteurisierten Milchproben von 0,13 bis 2,38 ng/g (Nguyen et al. 2015). Der *in vitro* Verdau von isoliertem A1- und A2-Beta-Casein mit Magen- und Duodenumsekreten von Menschen brachte das Ergebnis, dass in A1-Casein 4 mg/g Beta-Casein enthalten sind, in A2 jedoch nur 1,4 mg/g (Asledottir et al. 2017).

In handelsüblichem Joghurt konnte bisher kein BCM-7 nachgewiesen werden (De Noni et al. 2010; Nguyen et al. 2014). Im Labor hergestellter Joghurt wies eine geringe Menge an BCM-5 auf (1,1 ng/g), das allerdings durch Fermentation und Lagerung, vermutlich durch bakterielle Enzyme wie die X-Prolyldipeptidylaminopeptidase, rasch abgebaut wurde (Nguyen et al. 2014). Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Auswahl der Starterkulturen Einfluss auf die Fragmente hat, die aus BCM-5 und -7 entstehen (Nguyen et al. 2018). *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* zersetzten beide während der Fermentation von Milch zu Joghurt das zuvor zugesetzte BCM-7 vollständig, jedoch in unterschiedlich lange Bruchstücke aus zwei bis fünf Aminosäuren (Nguyen et al. 2018). Das Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) aus dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* erwies sich *in vitro* ebenfalls als geeignet, um BCM-7 zu zersetzen (Arisoy et al. 2018). Der Gehalt an Casomorphinen in Käse hängt von der Herstellungsart und den vorherrschenden Bedingungen während der Reifung (Salzgehalt, pH-Wert, Starterkulturen) ab (Muehlenkamp et al. 1996). So enthalten z.B. Schimmelkäsesorten wie Gorgonzola, Brie und Rokpol sehr viel mehr BCM-7, als die weniger salzigen Hartkäsesorten wie Grana Padano (Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009b; De Noni et al. 2015). Gorgonzola wies mit 7,63 µg/g den höchsten Gehalt an BCM-7 auf, durch *in vitro* Verdau wurde die Menge allerdings stark reduziert auf 0,89 µg/g (De Noni et al. 2015). Da die Darmbarriere von Säuglingen noch sehr viel durchlässiger ist, als die von Erwachsenen (Arévalo Sureda et al. 2016) wurde Säuglingsmilchnahrung ebenfalls eingehend auf das Vorhandensein von BCM-7 untersucht. In sechs verschiedenen kommerziellen Kuhmilch-basierten Säuglingsmilchpulvern wurden die Varianten A1, A2 und B des bovinen Beta-Caseins nachgewiesen und durch *in vitro* Verdau mit Pepsin und Corolase wurden 0,02-0,37 nmol/ml BCM-7 freigesetzt (De Noni 2008). Die Ultrahocherhitzung bei 156°C für 6-9 Sekunden veränderte nichts am BCM-Gehalt der Milchpulver (De Noni 2008). Nachfolgende Versuche derselben Arbeitsgruppe brachten mengenmäßig ein ähnliches Ergebnis und zeigten außerdem, dass die Sterilisation der Milchpulver die Freisetzung von BCM-7, vor

allem in Zubereitungen mit Zucker, signifikant hemmte (Cattaneo et al. 2017). Eine andere Arbeitsgruppe stellte selbst ein Milchersatzpulver aus reiner A2-Milch her und verglich dessen Gehalt an BCM-7 nach *in vitro* Verdau mit dem Gehalt in drei kommerziellen Milchersatzpulvern (Duarte-Vázquez et al. 2017). Sie konnten zeigen, dass das reine A2-Pulver mit rund 8,6 µg/ml signifikant geringere Mengen an BCM-7 aufwies als die kommerziellen, die durchschnittlich 20,9 µg/ml enthielten (Duarte-Vázquez et al. 2017). BCM-7 ist demnach in verschiedenen Lebensmitteln enthalten und kann durch *in vitro* Verdau freigesetzt werden (De Noni et al. 2015; Asledottir et al. 2017; Nguyen et al. 2018).

2.3.4 Nachweis und Absorption im Gastrointestinaltrakt

Der erste *in vivo* Nachweis einer Substanz, die im Radioimmunoassay mit Antikörpern gegen BCM-7 detektierbar war, erfolgte im Dünndarminhalt gesunder Menschen nach Aufnahme von einem Liter Kuhmilch (Svedberg et al. 1985). Die Wissenschaftler vermuteten, dass es sich bei der gefundenen Substanz um eine Vorstufe von BCM-7 handelte (Svedberg et al. 1985). Kurze Zeit später erfolgte der tatsächliche Nachweis eines Beta-Casomorphins mittels HPLC aus dem Duodenalsekret von Minischweinen nach der Fütterung von 100 g bovinem Casein (Meisel 1986). Die Aminosäuresequenz des isolierten Peptids entsprach den Aminosäuren 60-70 des bovinen Beta-Caseins und es zeigte opioide Aktivität in einem Opioidrezeptor-Bindungsversuch, weswegen es als BCM-11 bezeichnet wurde (Meisel 1986). In neueren klinischen Studien wurde auch die Entstehung von BCM-7 im Gastrointestinaltrakt (GIT) von Menschen nach Aufnahme von bovinem Beta-Casein nachgewiesen (Boutrou et al. 2013; Sanchón et al. 2018). Dazu wurde 16 erwachsenen Probanden über sechs Stunden nach Aufnahme von 30 g Casein über eine Nasensonde jejunales Sekret entnommen und mittels LC-MS/MS-Analyse auf seinen BCM-Gehalt untersucht (Boutrou et al. 2013). Die Wissenschaftler fanden BCM-7 in Konzentrationen von ca. 17 µmol/ml, die für eine agonistische Wirkung an Opioidrezeptoren ausreichen würde (Boutrou et al. 2013). Eine aktuellere Studie untersuchte die Peptidzusammensetzung in Jejunuminhalten von Probanden nach Aufnahme von 30 g bovinem Casein vergleichend mit einem vereinheitlichten *in vitro* Verdauprozess nach Vorgaben der europäischen Organisation INFOGEST (Sanchón et al. 2018). Diesem Protokoll folgend wurde das gefriergetrocknete Casein zunächst

in einer simulierten Speichelflüssigkeit gelöst und dann zwei Stunden mit einem künstlichen Magensekret mit porcinem Pepsin bei 37°C inkubiert und gemischt (Sanchón et al. 2018). Danach erfolgte die simulierte Dünndarmverdauung mit porcinem Pankreatin und Gallensalzen für weitere zwei Stunden (Sanchón et al. 2018). Sie fanden BCM-7 sowohl in den Jejunuminhalten der Probanden, als auch in den künstlich verdauten Proben und das Peptidprofil beider Verdauarten enthielt eine große Anzahl gleicher Sequenzen (Sanchón et al. 2018). Somit wurde gezeigt, dass BCM-7 im Dünndarm nach Caseinaufnahme in ausreichender Menge freigesetzt wurde, um eine opioide Wirkung zu entfalten (Boutrou et al. 2013) und dass das INFOGEST-Protokoll sehr gut geeignet ist, um die Verdauung von Casein im menschlichen GIT zu simulieren (Sanchón et al. 2018). Um Wirkungen außerhalb des GIT zu entfalten, muss BCM jedoch aus dem Darminhalt ins Blut aufgenommen werden und sich dort lange genug dem enzymatischen Abbau entziehen, um an seine Wirkungsorte zu gelangen. Zur Absorption von BCM-7 aus dem GIT wurden mehrere Studien an Tieren und am Menschen durchgeführt (Singh et al. 1989; Read et al. 1990; Kost et al. 2009). Im Blut neugeborener Kälber und Hundewelpen konnte nach Milchaufnahme mit einem Radioimmunoassay ein Peptid nachgewiesen werden, das von den spezifischen Antikörpern für BCM-7 erkannt wurde (Umbach et al. 1985; Singh et al. 1989). Allerdings wurde durch chromatographische Charakterisierung gezeigt, dass dieses Peptid länger ist als BCM-7 und, laut der Autoren, eine Vorstufe darstellen könnte, aus der BCM-7 freigesetzt werden kann (Singh et al. 1989). Im Plasma adulter Hunde konnte diese BCM-7-Vorstufe nach Milchaufnahme jedoch nicht nachgewiesen werden (Singh et al. 1989). Die Autoren vermuteten, dass durch die geringere Durchlässigkeit der Darmschleimhaut im Vergleich zu der von neugeborenen Welpen kein BCM-7 aus dem GIT aufgenommen wurde (Singh et al. 1989). Die tatsächliche Aufnahme von BCM-7 ins Blut konnte erstmals am intakten Darm von neugeborenen Lämmern und Ferkeln direkt nachgewiesen werden (Read et al. 1990). Dazu wurde ein Darmabschnitt der anästhesierten Tiere, unter Schonung der arteriellen Blutversorgung, vom restlichen Darm abgebunden und das venöse Blut aus diesem Abschnitt über Katheter gesammelt (Read et al. 1990). In den 30 min nach Injektion bestimmter Mengen BCM-7 ins Lumen dieses Darmabschnitts, wurde eine maximale Resorptionsrate von 0,065 µg/g Darmgewebe nach 1-4 min und eine Maximalkonzentration im Blut von ca. 20 µg/l für BCM-7 gemessen (Read et al. 1990). Das Peptid hatte allerdings nur

eine sehr kurze Halbwertszeit (< 5 min) im Blut und der absorbierte Anteil lag bei 0,06 % der injizierten Menge, was laut der Autoren auf einen sehr schnellen enzymatischen Abbau hinwies (Read et al. 1990). Im Blutplasma von Kleinkindern konnte bei Ernährung mit Kuhmilch-basierter Säuglingsnahrung eine Substanz festgestellt werden, die ähnliche Eigenschaften (Molekulargewicht und Polarität) wie bovines BCM-7 aufwies und durch Antikörper gegen BCM-7 detektiert werden konnte (Kost et al. 2009). Eine aktuelle Studie an Kälbern die 18 Tage lang ausschließlich mit A1- oder A2- Milch getränkt wurden zeigte, dass der Gehalt an BCM-7 im Blutplasma der A1-Gruppe an Tag 21 der Studie fast fünfmal höher war (55.82 versus 12.73 ng/ml) als bei der mit A2-Milch getränkten Gruppe (Hohmann et al. 2020). Um den Mechanismus der Aufnahme von BCM aus dem Verdauungstrakt genauer zu untersuchen, wurden Resorptionsstudien mit Monolayern der Darmzelllinie Caco-2 durchgeführt (Iwan et al. 2008; Jarmołowska et al. 2013). Es wurde bestätigt, dass der Transport von BCM-5 und -7 über die Zellmonolayer, als Modell für das menschliche Darmepithel, möglich ist, dass die Peptide jedoch innerhalb von 60 min, vorwiegend durch das Enzym DPPIV aus den Caco-2-Zellen, abgebaut werden (Iwan et al. 2008; Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009a). DPPIV ist eine Serinprotease, die in vielen Geweben und Zellen von Säugetieren exprimiert wird, z.B. in Enterozyten (Valencia-Sánchez et al. 2019). Das Enzym wird aber u.a. auch von T-Zellen und Adipozyten gebildet und tritt im Serum gelöst auf (Lamers et al. 2011; Cordero et al. 2015). Außerdem konnte es aus verschiedenen Schimmelpilzen und Bakterien isoliert werden (Divya et al. 2020). Die DPPIV ist in der Lage ein Prolin- oder Alanin-enthaltendes Dipeptid vom N-Terminus von Peptiden abzutrennen (Valencia-Sánchez et al. 2019). Aufgrund der Lokalisation von Prolinresten in seiner Aminosäuresequenz ist BCM-7 ein passendes Substrat für die DPPIV (Arisoy et al. 2018). Durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors für die DPPIV (Diprotin-A) wurde der Gehalt des durch Caco-2-Monolayer transportierten BCM-7 signifikant erhöht (Jarmołowska et al. 2013). Dies zeigte, dass die DPPIV aus den Caco-2-Zellen BCM-7 abbaut und die Hemmung des Enzyms zu einem erhöhten Gehalt des transportierten Peptids und somit potentiell zu einer höheren Bioverfügbarkeit *in vivo* führt (Jarmołowska et al. 2013). Die isolierte DPPIV aus dem Bakterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, das u.a. in der Darmflora vorkommt, konnte BCM-7 ebenfalls abbauen (Arisoy et al. 2018). Auch andere Bakterien der Darmflora, wie z.B. Bifidobakterien sind in der Lage BCM-7 abzubauen und damit unwirksam zu

machen (Sakurai et al. 2018). Um die Dauer der Zersetzung von BCM-7 durch Enzyme genauer zu erforschen, wurde es *in vitro* mit Verdauungssäften des Menschen und jejunalen Bürstensaummembran-Peptidasen des Schweins versetzt und die Bruchstücke mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie quantifiziert (Asledottir et al. 2019). Nach vier Stunden waren 79% des Ursprungspeptides in kleinere Fragmente zerlegt und nach 24 Stunden waren noch 5% davon vorhanden (Asledottir et al. 2019). Dieser Versuch zeigte, dass Verdauungsenzyme im Darm den Großteil des zugesetzten BCM-7 abbauten, dass jedoch nach 24 Stunden immer noch ein kleiner Anteil davon vorhanden war, der potentiell ins Blut gelangen könnte (Asledottir et al. 2019). Zusammengefasst konnte BCM-7 nach Caseinaufnahme im Darm nachgewiesen werden (Boutrou et al. 2013) und zumindest im Darmepithelmodell mit Caco-2-Zellen war auch die Absorption des Peptids möglich (Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009a). Ob intaktes BCM-7 jedoch wirklich fähig ist über die Darmepithelzellen ins Blut zu gelangen bleibt weiterhin fraglich (Asledottir et al. 2019). Die Aktivität der DPPIV im Darm und der damit einhergehende Abbau von BCM-7 ist der ausschlaggebende Faktor, der die Bioverfügbarkeit des Peptids bestimmt (Jarmołowska et al. 2013).

2.3.5 Effekte von Beta-Casomorphin auf den Gastrointestinaltrakt

Da BCM-7 vorwiegend an μ -Opioidrezeptoren wirkt und diese auch im Gastrointestinaltrakt gehäuft vorkommen, wurde die Wirkung von BCM-7 auf die Verdauung intensiv untersucht (Ho et al. 2014; Pal et al. 2015). Bereits in den 90er Jahren wurde *in vivo* an Hunden nachgewiesen, dass die intragastrale Verabreichung von Casein die Stärke und die Häufigkeit von Kontraktionen im Dünndarm signifikant hemmte (Defilippi et al. 1995). Schon in diesem Versuch wurde gezeigt, dass dieser Effekt durch eine Substanz mit opioider Wirkung (evtl. BCM) ausgelöst wurde, da der Effekt mit Naloxon aufhebbar war (Defilippi et al. 1995). Aktuellere Fütterungsversuche an Ratten zeigten, dass A1-Beta-Casein in der Diät die gastrointestinale Passagezeit im Vergleich zum A2-Casein Naloxon-reversibel um 2-3 Stunden verzögerte (Barnett et al. 2014). Analog dazu konnte am isolierten Colon von Ratten eine signifikante Hemmung der spontanen Motilität durch BCM-5 ausgelöst werden, die sowohl durch Zugabe von Naloxon als auch durch Waschen in Puffer reversibel war (Dalziel et al. 2014). BCM-7 erhöhte außerdem verschiedene

Parameter signifikant, die eine vermehrte Entzündungsreaktion im GIT anzeigen, wie z.B. die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase (Barnett et al. 2014; Ul-Haq et al. 2014b) und die Sekretion der Zytokine MCP-1 und IL-4 (Ul-Haq et al. 2014b). All diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass BCM-7 für die Symptome verantwortlich sein könnte, die häufig einer Laktoseintoleranz zugeschrieben werden (Ho et al. 2014). Einerseits könnten die Symptome direkt durch die Wirkung von BCM-7 auf den Darm verursacht werden, andererseits sind aber auch Störungen der Produktion des Laktose-abbauenden Enzyms (Laktase) durch BCM-7 oder die stärkere Fermentation der Laktose durch eine verlängerte Passagezeit als Ursachen denkbar (Pal et al. 2015). In verschiedenen klinischen Doppelblindstudien wurde die Wirkung von A1- und A2-Beta-Casein auf die Verdauung beim Menschen evaluiert (Ho et al. 2014; Jianqin et al. 2016; He et al. 2017). Der Konsum von A1-Beta-Casein führte im Vergleich zum A2-Casein sowohl zu signifikant höheren Werten für die Stuhlkonsistenz im Bristol Stool Score (weicherer Stuhl), als auch zu stärkeren Verdauungsbeschwerden wie Meteorismus, abdominalen Schmerzen und Verstopfung (Ho et al. 2014). Mithilfe von Endoskopie-Kapseln (Smart Pills) wurde festgestellt, dass die gastrointestinale Passagezeit mit A1-Casein enthaltender Milch auch beim Menschen signifikant verlängert ist und sie, im Vergleich zur A2-Milch, zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt (Jianqin et al. 2016). Die Auswertung der Videos aus den Kapseln wurde durch einen Gastroenterologen vorgenommen, der nicht wusste welches Casein die jeweiligen Probanden zu sich genommen hatten (Jianqin et al. 2016). Zusätzlich zu den gastrointestinalen Befunden fand die Arbeitsgruppe nach Konsum von konventioneller Milch (A1/A2) auch im Serum der Testpersonen eine signifikant erhöhte Konzentration an IL-4, IgG und IgE (Jianqin et al. 2016). Umfassendere klinische Studien mit Teilnehmern deren Fähigkeit Laktose zu verdauen durch einen Laktose-Toleranz-Test und durch Urin-Galaktose-Messung vorab getestet wurde, führten zu dem Ergebnis, dass A2-Milch im Vergleich zu konventioneller Milch die gastrointestinalen Symptome einer Laktoseintoleranz signifikant verringerte, obwohl der Laktose-Gehalt bei beiden Milchsorten gleich war (He et al. 2017; Milan et al. 2019). Die Bewertung der gastrointestinalen Symptome erfolgte anhand visueller Analogskalen durch die Probanden selbst, sowie durch die Messung von Wasserstoff in der Expirationsluft, der nach Aufnahme von konventioneller Milch signifikant höher war, als nach A2-Milch-Konsum (Milan et al. 2019). Diese Studien bekräftigten die Hypothese, dass die Symptome einer Laktose-

Intoleranz mit dem Vorkommen von A1-Beta-Casein assoziiert sind und nicht primär durch Laktose verursacht werden (He et al. 2017).

BCM-7 verursachte allerdings auch eine vermehrte Schleimproduktion der Becherzellen im Dünndarm, die für die Darmgesundheit förderlich sein könnte (Trompette et al. 2003; Zoghbi et al. 2006). Unter Einwirkung von BCM-7 konnte am isolierten, künstlich durchbluteten Jejunum von Ratten mittels ELISA eine Zunahme der Mucin-Glykoproteine beobachtet werden (Trompette et al. 2003). Diese Wirkung wurde ebenfalls an den Zelllinien HT29-MTX und DHE untersucht, die große Ähnlichkeit mit Becherzellen im Darm des Menschen haben (Zoghbi et al. 2006). Auch diese Zellen zeigten eine signifikante Steigerung der Schleimproduktion durch BCM-7, die durch Cyprodime (μ -Opioidantagonist) aufhebbar war (Zoghbi et al. 2006). Des Weiteren bewirkte die 30-tägige Verabreichung von BCM-7 in den Magen von Ratten eine Hemmung der Somatostatin-mRNA und dadurch sekundär eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression für Gastrin in der Magenschleimhaut (Zong et al. 2007). BCM-7 hat demnach deutliche Wirkungen auf gastrointestinale Funktionen und verursacht bei Laktose-intoleranten Personen eine Verschlechterung der Symptome (Summer et al. 2020).

2.3.6 Auswirkungen von Beta-Casomorphin-7 auf das Immunsystem

Wie bereits für andere opioide Stoffe beschrieben (siehe Kapitel 2.2.3), zeigte auch BCM-7 eine immunmodulatorische Wirkung in unterschiedlichen Studien (Elitsur et al. 1991; Kayser et al. 1996; Fiedorowicz et al. 2011). Bereits 1991 fand man heraus, dass BCM-7 die Proliferation von ConA-stimulierten Lamina propria Lymphozyten aus Kolon und Ileum des Menschen signifikant hemmte (Elitsur et al. 1991). Es wurde bestätigt, dass diese Wirkung durch Bindung an μ -Opioidrezeptoren vermittelt wurde, da die Hemmung mit dem Opioidantagonisten Naloxon komplett aufhebbar war (Elitsur et al. 1991). Casein wurde *in vitro* mit Verdauungsenzymen von Säugetieren und bakteriellen Enzymen verdaut, um die Wirkung der dabei entstehenden Peptide auf die Proliferation von Immunzellen zu untersuchen (Otani et al. 1995; Sütas et al. 1996). Sowohl mit Trypsin als auch mit Pankreatin *in vitro* verdautes Beta-Casein hemmte die Proliferation polyklonal stimulierter muriner Splenozyten und Peyer-Platten Lymphozyten des Kaninchens signifikant (Otani et al. 1995). Intaktes Beta-Casein sowie mit Pepsin bzw. mit Pepsin und Pankreatin

verdautes Casein bewirkten keine signifikante Veränderung der Proliferation der Zellen (Otani et al. 1995). Sütas et al. konnten ebenfalls eine signifikant hemmende Wirkung mit Pepsin und Trypsin verdauter Milch sowie Casein auf die Proliferation humaner PBMC feststellen (Sütas et al. 1996). Der zusätzliche Verdau des Caseins bzw. seiner Einzelkomponenten (α S1 und β) mit Enzymen aus dem Bakterium *Lactobacillus casei* verstärkte diese hemmende Wirkung noch (Sütas et al. 1996). Kayser et al. untersuchten als erste die Wirkung von BCM-7 auf Con-A stimulierte periphere Blutzellen des Menschen und fanden heraus, dass es in niedrigen Konzentrationen von 10^{-12} - 10^{-7} M eine Hemmung und mit höheren Konzentrationen ab 10^{-6} M eine Steigerung der Proliferationsrate bewirkte (Kayser et al. 1996). In einer ähnlichen Studie beobachtete eine andere Arbeitsgruppe eine signifikante Steigerung der Proliferation mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierter PBMC des Menschen mit 10^{-12} M BCM-7 aus Kuhmilch sowie menschlicher Muttermilch (Fiedorowicz et al. 2011). Das opioide Peptid hat demnach eindeutig einen Effekt auf die Proliferation von Immunzellen im Darm und im peripheren Blut, aber es ist noch nicht endgültig geklärt, ob es eine Steigerung oder eine Hemmung bewirkt (Elitsur et al. 1991; Kayser et al. 1996; Fiedorowicz et al. 2011). Neben der Wirkung auf die Proliferation, konnten auch noch andere Effekte auf die Funktion von Immunzellen nachgewiesen werden. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass periphere Blutleukozyten des Menschen *in vitro* durch Zugabe von BCM-7 Histamin freisetzen (Kurek et al. 1992). In klinischen Versuchen wurde BCM-7 Kindern und Erwachsenen intradermal injiziert und bewirkte eine pseudoallergische Hautreaktion durch Histaminausschüttung, die sowohl durch die vorherige Verabreichung von Histaminantagonisten als auch von Naloxon verhindert werden konnte (Kurek et al. 1992; Kurek et al. 1995). Auch auf die Zytokinsekretion von Immunzellen nimmt BCM-7 Einfluss, z.B. bewirkte es eine signifikante Erhöhung der Interleukin-8 (IL-8)-Sekretion und zugleich eine signifikante Verringerung der IFN- γ -Produktion durch humane PBMC (Fiedorowicz et al. 2011). IL-8 ist ein wichtiger Entzündungsmediator, der die Chemotaxis und Degranulation von neutrophilen Granulozyten anregt (Summer et al. 2020). Die Wirkungen von IFN- γ sind u.a. die Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen (Phagozytose-Steigerung) und die Förderung der MHC-I-Ausprägung auf infizierten Zellen zur Antigenpräsentation (Gu et al. 2020). Im GIT ließen sich durch BCM-7 Veränderungen in der Immunreaktion hervorrufen (Ul-Haq et al. 2014a). So zeigten Mäuse nach oraler Gabe des Peptids über 15 Tage sowohl

eine signifikante Erhöhung der IgE und IgG-Moleküle im Darmsekret und der Anzahl an Lymphozyten in den Darmzotten, als auch eine vermehrte mRNA-Expression für die Toll-like-Rezeptoren TLR-2 und -4 im Darmepithel (Ul-Haq et al. 2014a). Aktuelle Untersuchungen, in Form eines Fütterungsversuch mit Mäusen, zeigten erstmals auch negative Auswirkungen von BCM-7 auf die Funktion der Atemwege (Yadav et al. 2020). Mäuse, die eine Diät mit A1-Milch erhielten, zeigten signifikant höhere Konzentrationen der Interleukine IL-4 und -5 im Bronchoalveolarlavage-Sekret und im Serum, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit A2-Milch gefüttert wurde (Yadav et al. 2020). Die immunhistologische Untersuchung der Lungen zeigte in der A1-Gruppe eine vermehrte peribronchiale Entzündung mit lymphozytärer und eosinophilärer Infiltration des Gewebes und damit ähnliche Veränderungen wie sie bei allergischem Asthma beobachtet werden (Yadav et al. 2020). All diese Studien zeigen, dass bovines BCM-7 Auswirkungen auf immunologische Funktionen in verschiedenen Organsystemen und auf Immunzellen *in vitro* hat, die unserer Meinung nach weiterer Forschung bedarf. Deswegen untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation von PBMC des Schweins und des Rindes. Die PBMC dieser Tierarten wurden in diesem Zusammenhang bislang noch nicht untersucht (Stand der PubMed-Literaturrecherche 01.02.2021).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutproben von Schlachtschweinen, Rindern, Pferden und zwei Menschen verwendet. Die Schweine-Blutproben wurden am Schlachthof München unmittelbar bei der Tötung der Tiere beim Ausbluten gewonnen. Die Ausnahmegenehmigung für die Verwendung von tierischen Nebenprodukten zu Lehr- und Forschungszwecken wurde uns vom Abfallwirtschaftsbetrieb München erteilt. Die aktuelle Genehmigungsnummer lautet: DE 09 162 0008-21. Des Weiteren wurden Blutproben von Kühen des Lehr- und Versuchsgutes in Oberschleißheim entnommen. Die Blutprobenentnahme der Rinder ist der Regierung von Oberbayern unter der Genehmigungsnummer 55.2-1-54-2532.3-22-12 angezeigt. Die Pferdeblutprobe wurde in der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen der klinischen Diagnostik entnommen und wird somit nicht als Tierversuch angesehen. Demnach war hierfür keine behördliche Genehmigung notwendig.

Aus dem Blut der aufgeführten Tiere wurden unter sterilen Bedingungen PBMC isoliert. Die Zellen wurden jeweils in verschiedenen Experimenten eingesetzt. Die humanen Blutproben wurden den jeweiligen Personen im Rahmen von Routineuntersuchungen beim Hausarzt entnommen und die PBMC wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen präpariert. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Schweinen unmittelbar nach der Schlachtung Hirn- und Darmstücke entnommen und daraus histologische Präparate erstellt. Die Untersuchung an porcinen Peyer-Platten-Lymphozyten erfolgte ebenfalls mit dem auf diesem Wege erhaltenen Probenmaterial. Hierfür gilt dieselbe Ausnahmegenehmigung wie für die Entnahme der Blutproben.

Die Milchproben, die in einem Teil der Experimente verwendet wurden, stammten von zwei genotypisierten Kühen am Lehr- und Versuchsgut. Eine Kuh war reinerbig für das A1-Beta-Caein (A1/A1), die andere für A2 (A2/A2).

3.2 Aufbereitung der Blutproben und Isolierung der PBMC

3.2.1 Puffer und Lösungen

Heparinlösung zur Gerinnungshemmung (2.500 I.E./ml)

Heparin-Natrium (25.000 I.E./ml) ¹	1,00 ml
RPMI 1640 Medium mit Glutamin ²	9,00 ml

Trennlösung zur Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung³ (Dichte 1,077 g/ml), gebrauchsfertig.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl ⁴ (136,9 mM)	8,00 g
KCl ⁴ (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ ⁴ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ ⁴ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g

In 1000 ml Aqua dest. lösen und pH auf 7,4 einstellen.

3.2.2 Gewinnung der Blutproben

Nach Desinfektion der Injektionsstelle wurde den Rindern je nach Bedarf zwischen 10 und 100 ml Blut aus der *Vena jugularis externa* entnommen. Die Blutprobengewinnung bei den Schweinen erfolgte über die eröffnete *Vena jugularis externa* bei der Tötung am Schlachthof. Zur Gerinnungshemmung wurden pro 50 ml Blut je 1 ml Heparinlösung (2.500 I.E./ml) zugegeben.

Die humanen Blutproben wurden vom jeweiligen Hausarzt der Personen unserer Arbeitsgruppe bei Routineuntersuchungen mit abgenommen.

¹ Ratiopharm, Ulm

² Anprotec, Bruckberg

³ Pan Biotech, Aidenbach

⁴ Applichem, Darmstadt

3.2.3 Isolierung der PBMC

Das Rinderblut wurde 1:2 mit PBS verdünnt, das Schweine- und Menschenblut wurde unverdünnt verwendet. Das Blut, bzw. die Blutverdünnung, wurde unter sterilen Bedingungen auf bereits vorbereitete Röhren⁵ mit Pancoll Trennlösung geschichtet. Hierbei wurden je nach Blutmenge vorsichtig jeweils 25 ml Blut auf 15 ml Pancoll oder 5 ml Blut auf 3 ml Pancoll pipettiert. Die Röhren wurden dann bei Raumtemperatur für 25 min zentrifugiert (500 rcf, Bremse ausgeschaltet). Die dadurch zwischen Plasma- und Pancollschicht entstandene Interphase wurde mit einer serologischen Pipette⁵ abgenommen und in Röhren mit 30 ml kaltem PBS überführt. Diese Interphase besteht, durch die Auftrennung der einzelnen Bestandteile nach ihrer Dichte, hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten. Zusammengefasst werden diese als periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) bezeichnet. Die weitere Präparation erfolgte bei 4°C, um eine möglichst hohe Vitalität der Zellen zu gewährleisten. Die isolierten Zellen wurden zunächst gewaschen, also zentrifugiert (500 rcf, 10 min, 4°C, Bremse angeschaltet) und der Überstand verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde erneut in kaltem PBS resuspendiert und gewaschen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde das Zellpellet, je nach Größe, in einem definierten Volumen PBS resuspendiert.

3.2.4 Manuelle Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau⁶ versetzt (Verdünnung 1:2) und die Mischung in eine Neubauer-improved Zählkammer⁷ (Kammertiefe 0,1 mm) gegeben. Es wurden alle 25 Gruppenquadrate ausgezählt (Fläche pro Gruppenquadrat 0,04 mm²). Zur Berechnung der Zellzahl diente folgende Formel:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

⁵ Sarstedt, Nümbrecht

⁶ VWR, Darmstadt

⁷ NeoLab, Heidelberg

3.3 In vitro Verdau von Milch

3.3.1 Puffer und Lösungen

Simulierter Magensaft, pH 3,0

KCl ⁸ (6,9 mM)	0,25 g
KH ₂ PO ₄ ⁸ (0,9 mM)	0,05 g
NaHCO ₃ ⁸ (25 mM)	1,05 g
NaCl ⁸ (47,2 mM)	1,38 g
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ ⁸ (0,1 mM)	0,01 g
NH ₄ HCO ₃ ⁸ (0,5 mM)	0,02 g

In 500 ml Aqua bidest lösen, pH-Wert mit 1 M HCl auf 3,0 einstellen

Simulierter Dünndarmsaft, pH 7,0

KCl ⁸ (6,9 mM)	0,25 g
KH ₂ PO ₄ ⁸ (0,9 mM)	0,05 g
NaHCO ₃ ⁸ (85 mM)	3,57 g
NaCl ⁸ (38,4 mM)	1,12 g
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ ⁸ (0,33 mM)	3,50 mg

In 500 ml Aqua bidest lösen, pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,0 einstellen.

Calciumchlorid-Lösung

CaCl ₂ ⁸ (0,3 M)	4,41 g
--	--------

In 100 ml Aqua dest. lösen.

Diese drei Lösungen wurden vor dem Einsatz in der Zellkultur steril filtriert.

Proteaseinhibitor-Lösung

Complete EDTA-free ⁹	1 Tablette
---------------------------------	------------

In 2 ml sterilem Aqua dest. lösen.

⁸ Applichem, Darmstadt

⁹ Boehringer, Mannheim

3.3.2 Gewinnung und Vorbereitung der Milchproben

Die Milchproben wurden am Lehr- und Versuchsgut (LVG) der LMU München in Oberschleißheim nach sorgfältiger Reinigung und Desinfektion der Zitzen gemolken und gekühlt transportiert. Die verwendeten Kühe waren jeweils reinerbig für das Merkmal A1- oder A2-Casein. Die Milchproben wurden zunächst entfettet. Dazu wurden sie in 50ml Röhren¹⁰ abgefüllt und 20 min bei 4°C mit 2000 rcf zentrifugiert. Danach wurde das Fett, dass sich oben als feste Phase abgesetzt hatte, mit einem Löffel abgenommen. Die Milch wurde dann durch einen Papierfilter¹¹ gefiltert, um die restlichen Fettflocken zu entfernen. Anschließend wurde ein Teil der Milch sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.3.3 Magenphase des Verdauprozesses

Der *in vitro* Verdau der Milch wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll durchgeführt, das nach Richtlinien des COST-Infogest Netzwerkes erstellt wurde (Minekus et al. 2014). Die Milch wurde im Verhältnis 1:2 mit dem simulierten Magensaft gemischt und der pH-Wert der Mischung mit HCl (1M) wieder auf 3,0 eingestellt. In einem Überkopfschüttler¹², der in einem Wärmeschrank¹³ platziert war, wurde die Milch, bei 37°C, 10 Minuten lang inkubiert und dabei langsam geschwenkt. Im Anschluss daran wurde Pepsin¹⁴ (3,2 mg/ml) sowie Calciumchloridlösung (Endkonzentration: 0,075 mM) zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 37°C unter regelmäßigem Schwenken inkubiert.

3.3.4 Dünndarmphase des Verdauprozesses

Die vorverdaute Mischung wurde 1:2 mit dem simulierten Dünndarmsaft gemischt und der pH-Wert mit NaOH-Lösung (1M) auf 7,0 eingestellt, um die Wirkung des

¹⁰ Sarstedt, Nümbrecht

¹¹ Schleicher und Schuell, Dassel

¹² NeoLab, Heidelberg

¹³ Heraeus, Hanau

¹⁴ Applichem, Darmstadt

Pepsins zu stoppen. Dann wurde Natrium-Taurocholat¹⁵ (1,6 mg/ml) zugegeben und die Mischung abermals für 10 Minuten unter Schwenken bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden Pankreatin¹⁶ (1,6 mg/ml) und Calciumchloridlösung (Endkonzentration: 0,3 mM) zugegeben. Der pH-Wert wurde nochmals kontrolliert und gegebenenfalls erneut mit NaOH (1M) auf 7,0 angepasst. Auch in dieser Phase wurde das Gemisch zwei Stunden lang bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Zum Abschluss des Verdaus wurde die Wirkung der Proteasen aus dem Pankreatin mit der Proteaseinhibitor-Lösung (40 µl/ml) abgestoppt, welche eine Stunde bei Raumtemperatur wirken konnte. Die unverdauten Milchproben, sowie die verdauten Milchlösungen, wurden für den Einsatz in der Zellkultur steril filtriert.

3.4 Lymphozytenproliferation

3.4.1 Puffer und Lösungen

RPMI-Gebrauchsmedium

RPMI 1640 Medium mit Glutamin ¹⁷	445,00 ml
Penicillin/Streptomycin ¹⁷ (Pen/Strep)	5,00 ml
fetales Kälberserum ¹⁸ (FCS)	50,00 ml

[³H]-Thymidin-Lösung (0,05 mCi/ml)

[Methyl- ³ H] Thymidin ¹⁹ (1.0 mCi/ml)	0,50 ml
RPMI 1640 Medium mit Glutamin ¹⁷	9,50 ml

3.4.2 Durchführung der Proliferationsassays

Die PBMC wurden unter sterilen Bedingungen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Delle in je 200 µl RPMI-Gebrauchsmedium in eine sterile 96-Lochplatte (Flachboden)²⁰ für Suspensionszellen ausgesät. Für jeden Ansatz wurden entweder Triplikate oder

¹⁵ Alfa Aesar, Kandel

¹⁶ Applichem, Darmstadt

¹⁷ Anprotec, Bruckberg

¹⁸ Biochrom, Berlin

¹⁹ Perkin Elmer, Hamburg

²⁰ Sarstedt, Nümbrecht

Duplikate erstellt. Die porcinen Zellen wurden mit 1 µg/ml Concanavalin A (ConA)²¹, Bananenlektin (BanLec)²², Pokeweed Mitogen (PWM)²¹ sowie 5 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA)²³ stimuliert. In Vorversuchen haben wir festgestellt, dass bei ConA, BanLec und PWM eine Konzentration von 1 µg/ml ausreicht, um eine mitogene Wirkung auf die Zellen auszulösen, dass bei der Verwendung von PHA jedoch eine höhere Konzentration notwendig ist. Zur Proliferationsanregung der Rinderzellen benötigt man erfahrungsgemäß auch eine höhere Konzentration von ConA zur Stimulation, sodass hier eine Endkonzentration von 5 µg/ml gewählt wurde. Zusätzlich zur ConA-Stimulation wurden die Zellen mit BCM-7²⁴, Naloxon²⁵ und verschiedenen selektiven Opioiden versetzt, um deren Wirkung zu untersuchen (Konzentrationen siehe nachfolgende Tabelle). Die verwendeten Konzentrationen haben sich in Versuchen unserer Kooperationspartner am Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der LMU München als pharmakologisch wirksam erwiesen. Naloxon wurde an die Konzentration des jeweiligen Agonisten angepasst. Mit BCM-7; DAMGO²⁴, U69,593²⁵ und Deltorphin II²⁴ wurde Naloxon in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Morphin²¹ musste in einer höheren Konzentration eingesetzt werden, als die anderen opioiden Substanzen, um eine pharmakologisch wirksame Dosis im Well zu erhalten. Demnach musste die Konzentration von Naloxon auf 100 µM angepasst, um eine ausreichende Inhibition zu gewährleisten. In nachfolgender Tabelle sind alle in den Proliferationsversuchen verwendeten Substanzen aufgelistet.

Substanz	Herkunft	Konzentration in Delle
Concanavalin A (ConA)	Merck, Darmstadt	1 µg/ml, 5 µg/ml (Rind)
Bananen-Lektin (BanLec)	Linaris, Dossenheim	1 µg/ml
Phytohämagglutinin (PHA)	Pan Biotech, Aidenbach	5 µg/ml
Pokeweed Mitogen (PWM)	Merck, Darmstadt	1 µg/ml
Betacasomorphin-7 (BCM-7)	Bachem, Bubendorf (Schweiz)	10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁴ , 0,01, 1, 100 µg/ml
Naloxon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	10 und 100 µM
D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol-	Bachem, Bubendorf	1 µM

²¹ Merck, Darmstadt

²² Linaris, Dossenheim

²³ Pan Biotech, Aidenbach

²⁴ Bachem, Bubendorf, Schweiz

²⁵ Sigma Aldrich, Taufkirchen

Enkephalin (DAMGO)	(Schweiz)	
U69, 593	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1 μ M
Deltorphin II	Bachem, Bubendorf (Schweiz)	1 μ M
Morphin	Merck, Darmstadt	10 μ M
Milch (A1 und A2), roh	LVG Oberschleißheim	0,5 %
Milch (A1 und A2), verdaut	LVG Oberschleißheim	0,5 %

Die Inkubation der Zellen erfolgte für 32 Stunden im Brutschrank²⁶ bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5%. Anschließend wurden die Zellen mit 20 μ l der radioaktiven [³H]-Thymidin-Lösung pro Delle (1 μ Ci/Kavität) versetzt und weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Dauer der Stimulation betrug also insgesamt 48 Stunden. Nach dieser Stimulationsphase wurden die Zellen mit einem Zellernte-Gerät²⁷ auf spezielle Glasfaserfilter²⁸ geerntet, welche bei 80°C im Trockenschrank²⁹ für mindestens 30 min getrocknet wurden. Die Glasfaserfilter wurden in Omni Filterkassetten²⁸ eingespannt, mit 25 μ l Szintillationsflüssigkeit²⁸ pro Delle versetzt und die Kassette dann mit einer selbstklebenden Folie²⁸ versiegelt. Anschließend erfolgte die [³H]-Aktivitäts-Messung in einem Beta-Zähler (Microbeta²⁸). Die Zellen bauen das radioaktive Nukleotid [³H]-Thymidin²⁸ während der S-Phase des Zellzyklus in ihre DNA ein. So kann aus der Höhe der counts per minute (cpm-Werte) darauf geschlossen werden wie stark die Zellen proliferiert haben.

3.4.3 Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten

Für die statistische Auswertung der Zellproliferationsraten wurden aus den cpm-Werten zunächst Proliferationsindizes berechnet. Hierfür wurden Mittelwerte aus den cpm-Werten jedes Triplikates/Duplikates gebildet. Anschließend wurden die Mittelwerte der mit den Mitogenen stimulierten und mit BCM-7, Naloxon bzw. den verschiedenen Opioiden behandelten Zellen eines jeden Tieres durch die Werte der Kontrolle (nur mit Mitogenen stimuliert) desselben Tieres dividiert. Der

²⁶ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

²⁷ Packard, Dreieich

²⁸ Perkin Elmer, Hamburg

²⁹ Memmert, Schwabach

Proliferationsfaktor für die Kontrolle betrug aufgrund dieser Berechnung immer 100%. Anhand der Proliferationsindizes konnten Unterschiede in den Proliferationsraten der Lymphozyten zwischen behandelten und unbehandelten Zellen verglichen werden. Die ermittelten Proliferationsindizes wurden mit der Kontrolle verglichen und mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung, also bei nicht signifikantem KS-Test ($p \geq 0,05$) wurde der Student's t -Test zur weiteren Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten ($p < 0,05$) fand der Mann-Whitney-Test Anwendung. In beiden Tests wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen behandelten Zellen und der Kontrolle mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.5 Präparation der Lymphozyten aus porcinen Peyer-Platten

3.5.1 Puffer und Lösungen

Hank`s balanced salt solution (HBSS), pH 7,4

NaCl ³⁰ (136,9 mM)	8,00 g
KCl ³⁰ (5,4 mM)	0,40 g
KH ₂ PO ₄ ³⁰ (0,4 mM)	0,06 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ³⁰ (0,3 mM)	0,06 g
NaHCO ₃ ³⁰ (4,1 mM)	0,35 g
D-Glukose ³¹ (5,5 mM)	1,00 g
In 1000 ml Aqua dest. lösen.	

PBS

siehe Kapitel 3.2.1

Trennlösung zur Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung³² (Dichte 1,077 g/ml), gebrauchsfertig.

³⁰ Applichem Darmstadt

³¹ Merck, Darmstadt

³² Pan Biotech, Aidenbach

3.5.2 Gewinnung der Darmproben

Frisch geschlachteten Schweinen wurden am Schlachthof mehrere ca. 10 cm lange Stücke Ileum entnommen, an denen makroskopisch eine Peyer-Platte erkennbar war. Diese Stücke wurden in HBSS-Lösung auf Eis transportiert. Die Vitalität der Zellen war nach Transport in dieser Lösung deutlich besser als in PBS.

3.5.3 Isolierung der Lymphozyten aus den Peyer-Platten

Die Darmstücke wurden zunächst sehr gründlich von Fett und anhängendem Mesenterium befreit, in kaltem PBS gewaschen und an der mesenterialen Seite mit einer Schere eröffnet. Dann wurde auch die Innenseite der Darmstücke gut in PBS gewaschen bis die Waschflüssigkeit klar blieb. Danach wurden die makroskopisch gut erkennbaren Peyer-Platten mit einer spitzen Schere vom restlichen Darm abgetrennt. Über die isolierte Peyer-Platte wurde vorsichtig mit einem Skalpell geschabt, um die Mukosa und möglichst viel Schleim zu entfernen und anschließend nochmals gründlich in PBS gewaschen. Die saubere Platte wurde an einem Ende mit einer Pinzette fixiert und die Lymphfollikelschicht mit den darin enthaltenen Lymphozyten wurde mit der Querseite eines Objektträgers vorsichtig von Serosa und *Tunica muscularis* getrennt. Das so gewonnene Gewebe wurde in ein Sieb (Porengröße 60 µm) überführt, welches in einer Petrischale aus Glas platziert war. Und nach Zugabe von 10 ml PBS mit dem Stempel einer 20 ml-Spritze durch das Sieb gedrückt. Durch Nachspülen mit PBS wurden die restlichen Zellen in die Petrischale befördert und die daraus entstandene Zellsuspension wurde mit einer serologischen Pipette³³ in eine Röhre³³ überführt. Nach 10 min Sedimentation auf Eis wurden je 5 ml des Überstandes in vorbereitete 15 ml Röhrchen auf je 5 ml Pancoll Trennlösung³⁴ geschichtet. Direkt im Anschluss wurden die Röhrchen 25 min lang bei Raumtemperatur mit 500 rcf und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Die dadurch entstandene Interphase zwischen Pancoll und Gewebssuspension wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen mit kaltem PBS überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 3.2.4).

³³ Sarstedt, Nümbrecht

³⁴ Pan Biotech, Aidenbach

3.6 Anzucht von Darmzelllinien

3.6.1 Puffer und Lösungen

DMEM-Gebrauchsmedium

DMEM Medium mit Glutamin ³⁴	445,00 ml
FCS ³⁵	50,00 ml
Pen/Strep ³⁶	5,00 ml

Trypsin-EDTA

Trypsin-EDTA³⁶, gebrauchsfertig

3.6.2 Kultur der Darmzelllinien

Die verwendeten Darmzelllinien Caco-2³⁷, HT-29³⁷ und IPEC-J2³⁷ wurden in sterilen Zellkulturflaschen³⁸ in DMEM-Gebrauchsmedium bis zur 80%igen Konfluenz kultiviert (37°C, 5% CO₂). Dies wurde durch mikroskopische Kontrolle beurteilt. Nach Ablösen der adhären Zellen mit Trypsin-EDTA wurde jeweils die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.2.4). Je nach Zellzahl wurden die Zellen entweder zur weiteren Vermehrung auf zwei Flaschen aufgeteilt und bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert oder direkt für die RNA-Extraktion verwendet.

³⁵ Biochrom, Berlin

³⁶ Anprotec, Bruckberg

³⁷ ATCC, Wesel (erhalten von Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtelbauer)

³⁸ Sarstedt, Nümbrecht

3.7 Molekularbiologischer Nachweis der Opioidrezeptoren

3.7.1 Puffer und Lösungen

DEPC-behandelte Lösungen

PBS oder Aqua dest. 500,00 ml

DEPC³⁹ 0,50 ml

12 Std. auf einem Magnetrührer mischen und anschließend autoklavieren.

RLT-Lysepuffer

RLT-Puffer aus RNeasy Midi Kit⁴⁰ 10,00 ml

Mercaptoethanol⁴¹ 0,10 ml

Ansatz zur Eliminierung genomischer DNA (gDNA)

gDNA Eliminierungspuffer (7x)⁴² 4,00 µl

RNA, 2 µg Variabel

Mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 28 µl auffüllen und für 2min bei 42°C im Wasserbad inkubieren.

Master Mix für die reverse Transkription

Quantiscript RT Puffer (5x)⁴² 8,00 µl

Quantiscript Reverse Transkriptase⁴² 2,00 µl

RT Primer Mix⁴² 2,00 µl

TAE-Laufpuffer für Gelelektrophorese

Tris⁴³ (40 mM) 4,85 g

Eisessig⁴⁴ (20 mM) 1,20 g

NaEDTA⁴⁵ (1 mM) 0,29 g

In 1000 ml Aqua dest. lösen.

³⁹ Applichem, Darmstadt

⁴⁰ Qiagen, Hilden

⁴¹ Merck, Darmstadt

⁴² Qiagen, Hilden

⁴³ Carl Roth, Karlsruhe

⁴⁴ Sigma Aldrich, Taufkirchen

⁴⁵ Applichem, Darmstadt

Agarose-Gel (1,8%)

Agarose ⁴⁵	0,90 g
TAE-Laufpuffer	50,00 ml
Roti-Safe Gelstain ⁴³	3,50 µl

In Mikrowelle aufkochen bis Flüssigkeit klar bleibt.

3.7.2 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der RNA aus den verschiedenen Zellen wurde das RNeasy Midi Kit⁴⁶ verwendet. Die verwendete Zellzahl variierte je nach Zellart und Vorbehandlung (siehe nachfolgende Tabelle). Mit den Säulen des Kits können 5×10^6 bis 1×10^8 Zellen verarbeitet werden.

Zellart	Behandlung	Verwendete Zellzahl
PBMC, Schwein	keine	1×10^8
PBMC, Schwein	Stimulation mit ConA	$2,5 \times 10^7$
Peyer-Platten-Lymphozyten, Schwein	keine	5×10^7
Peyer-Platten-Lymphozyten, Schwein	Stimulation mit ConA	4×10^7
PBMC, Mensch	keine	4×10^7
HT-29 (Kolonkarzinomzelllinie, Mensch)	keine	7×10^7
Caco-2 (Kolonkarzinomzelllinie, Mensch)	keine	4×10^7
IPEC-J2 (Darmzelllinie, Schwein)	keine	1×10^7

Die Zellen wurden zweimal in DEPC-behandeltem PBS gewaschen und die gewünschte Zellzahl durch Zentrifugation pelletiert (500 rcf, 10 min, 4°C). Die Extraktion der RNA erfolgte nach dem Protokoll aus dem Qiagen Handbuch, welches dem Kit beilag. Zusammengefasst wurde das Pellet durch Schnippen ans Röhrchen aufgelockert und dann je nach Zellzahl 2 bis 4 ml Lysepuffer (RLT) hinzugefügt. Zusätzlich wurden die Zellen sofort mit einem elektrischen Homogenisator (Polytron PT 1200 CL)⁴⁷ mechanisch lysiert. Zum Lysat wurde die gleiche Menge Ethanol (70%)⁴⁸ zugegeben wie zuvor RLT-Puffer⁴⁶ und die Lösung durch kräftiges Schütteln gemischt. Anschließend wurde das Lysat auf die RNeasy-Säulen pipettiert, welche in

⁴⁶ Qiagen, Hilden

⁴⁷ Kinematica AG, Littau, Schweiz

⁴⁸ CLN, Freising

15ml-Sammelröhrchen⁴⁶ steckten. Diese wurden mit 5000 rcf in einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor⁴⁹ für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zur Erhöhung der RNA-Ausbeute mit dem Durchfluss wiederholt. Dann wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 4 ml RW1-Puffer (1.Waschpuffer)⁴⁶ gewaschen (5 min, 5000 rcf). Dieser Durchfluss wurde ebenfalls verworfen und der Waschschrift mit 2,5 ml des nächsten Waschpuffers (RPE-Puffer⁵⁰) zweimal wiederholt. Beim ersten Waschschrift mit dem zweiten Puffer wurden die Säulen 2 min zentrifugiert, beim zweiten Mal 5 min, damit die Säule komplett trocken war. Die gereinigte RNA befand sich auf der Silikat-Gel-Membran der Säule und wurde nun eluiert. Dazu wurde die Säule in ein frisches Sammelröhrchen gesteckt und es wurden 150 µl RNase-freies Wasser⁵⁰ zugegeben, 1 min inkubiert und dann 3 min bei 5000 rcf zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem erhaltenen Eluat wiederholt um die RNA-Konzentration zu erhöhen. Danach wurde die RNA sofort in einem RNase-freien 1ml-Reagiergefäß⁵¹ auf Eis gelagert und die RNA-Konzentration mit einem Spektrophotometer⁵² beurteilt. Die erhaltenen RNA-Konzentrationen aus den primären Zellen betrugen für die einzelnen Extrakte zwischen 314 und 557 ng/µl. Die Konzentrationen bei den Darmzelllinien lagen zwischen 1308 und 1684 ng/µl. Die Reinheit der RNA wurde ebenfalls überprüft. Dazu wurden die Verhältnisse der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ($A_{260/280}$) und bei 260 und 230 nm ($A_{260/230}$) herangezogen. Folgende Werte, die reine RNA normalerweise aufweist, wurden angestrebt:

$A_{260/280}$: 2,00

$A_{260/230}$: 2,20.

Wich einer dieser Werte zu stark vom Zielwert ab, wurde die RNA-Extraktion wiederholt. 2 µg der RNA wurden jeweils zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) verwendet, der Rest wurde bei - 80°C asserviert.

⁴⁹ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

⁵⁰ Qiagen, Hilden

⁵¹ Sarstedt, Nümbrecht

⁵² Implen, München

3.7.3 cDNA-Synthese

Die cDNA aus den jeweiligen RNA-Proben wurde mit dem Quantitect Reverse Transcription Kit⁵⁰ nach Anleitung synthetisiert. Die komplette Präparation wurde auf Eis durchgeführt, um das Risiko der RNA-Zersetzung zu minimieren.

Für die porcinen Zellen wurde eine Mischung zu gleichen Teilen aus dem Primer-Mix des Kits und folgenden spezifischen Reverse-Primern für die porcinen Opioidrezeptoren verwendet:

Target	Bezeichnung	Sequenz
pOPRD1 ⁵³	sOPRD_kurz_rev	AAG TTC TCG TCC AGG AAG GC
pOPRK1 ⁵³	sOPRK_kurz_rev	ACA GAT GAC GAC AGG ATC CAA
pOPRM1 ⁵³	sOPRM_kurz_rev	CAG CCC ATA ACA CAC CGT AAT G

Für die humanen Zellen wurde der im Kit enthaltene Standard-Primermix verwendet. Die Komponenten des Kits wurden aufgetaut und danach sofort auf Eis gelagert. In Nuklease-freien 1ml-Reagiergefäßen⁵⁴ wurden zunächst die Komponenten für die Eliminierung der genomischen DNA gemischt und der Master-Mix für die reverse Transkription vorbereitet (siehe 3.7.1). Nach Inkubation im Wasserbad (2 min, 42 °C) wurde der Ansatz zur Eliminierung der genomischen DNA zum vorbereiteten Mastermix gegeben und diese Mischung nochmals 15 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Ansatz abschließend für 3 min bei 95°C in einem ThermoMixer⁵⁵ erhitzt. Konzentration und Reinheit der so synthetisierten cDNA wurden mit dem Spektrophotometer⁵⁶ beurteilt. Die Konzentration der cDNA lag zwischen 944 und 1363 ng/µl. Die Zielwerte der Absorptionsverhältnisse lagen bei:

$A_{260/280}$: 1,8

$A_{260/230}$: 1,5

Bei ausreichender Reinheit und Konzentration der cDNA wurden die Proben tiefgefroren (-20°C) bis zur weiteren Verwendung.

⁵³ Eurofins Genomics, Ebersberg

⁵⁴ Sarstedt, Nümbrecht

⁵⁵ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

⁵⁶ Implen, München

3.7.4 Durchführung der PCR

Es wurde je ein Ansatz für jeden Opioidrezeptortyp und die GAPDH pro cDNA-Template in 0,1 ml Reagiergefäßen⁵⁴ angesetzt. Die porcine Hypothalamus-cDNA⁵⁷ für die Positivkontrolle wurde kommerziell erworben, die restlichen verwendeten cDNA-Templates wurden, wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, selbst hergestellt.

Aus der cDNA, den Primern, dem Mastermix und Wasser wurden nach folgendem Schema die Ansätze für die PCR hergestellt:

cDNA Template	2,50 µl
Forward-Primer	2,50 µl
Reverse-Primer	2,50 µl
2x Mastermix Q5 Polymerase ⁵⁸	25,00 µl
H ₂ O	17,50 µl

Folgende Tabellen geben die Sequenzen der verwendeten Primer an:

Primer für porcine Zellen:

Target	Bezeichnung	Sequenz
pOPRD1 ⁵⁹	sOPRD_kurz_fwd	GAG CGT CGA CCG CTA TAT T
	sOPRD_kurz_rev	AAG TTC TCG TCC AGG AAG GC
pOPRK1 ⁵⁹	sOPRK_kurz_fwd	GTC ATC ATC ACG GCG GTC TA
	sOPRK_kurz_rev	ACA GAT GAC GAC AGG ATC CAA
pOPRM1 ⁵⁹	sOPRM_kurz_fwd	CCA GTA CCC TAC CCT TCC AGA
	sOPRM_kurz_rev	CAG CCC ATA ACA CAC CGT AAT G
pGAPDH ⁵⁹	sGAPDH_fwd	ATC CCG CCA ACA TCA AAT GGG
	sGAPDH_rev	CCA GTG AGC TTC CCG TTG AG

⁵⁷ Thermo Fisher Scientific, Schwerte

⁵⁸ New England BioLabs, Frankfurt am Main

⁵⁹ Eurofins Genomics, Ebersberg

Primer für humane Zellen:

Target	Bezeichnung	Sequenz
MOR ⁶⁰	rhMOR_fwd	5'-ATGAAGACTGCCACCAACATCTAC-3'
	rhMOR_rev	5'-GAAGAGAGGATCCAGTTGCAGAC-3'
DOR ⁶⁰	mhDOR_fwd	5'-GATGCGCTGGCCACCAGCAC-3'
	mhDOR_rev	5'-GAACACGCAGATCTTGGTCAC-3'
KOR ⁶⁰	hKOR_fwd	5'-ACATTGCCGTGTGCCACCCC-3'
	hKOR_rev	5'-TGCCACCACCACCAGGACCA-3'
GAPDH ⁶⁰	GAPDH_fwd	5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3'
	GAPDH_rev	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

Die PCR mit diesen Ansätzen wurde dann im Thermocycler (T Professional BASIC)⁶¹ durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierungsphase von 3 min bei 98°C folgten 30 Zyklen der DNA-Vervielfältigung. Dabei wurde eine Temperatur von 60°C für die Primeranlagerung (Annealing) gewählt. Aufgrund der erwarteten Fragmentlängen (400-600 Basenpaare) wurde eine Elongationszeit von 60 Sekunden eingestellt.

Phase der Reaktion	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 min	98°C
Denaturierung	30 sec	98°C
Annealing	30 sec	60°C
Elongation	60 sec	72°C
Finale Elongation	2 min	72°C

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Fragmente anhand ihrer Größe.

Die Zutaten für das Agarose-Gel (siehe 3.7.1) wurden in einem Erlenmeyerkolben gemischt und mehrmals kurz in einer Mikrowelle aufgeköcht. Die Verdampfungsverluste wurden mit Aqua dest. ersetzt. Die Flüssigkeit wurde in eine Gelelektrophoresekommer⁶² gegossen, ein Kamm diente als Platzhalter für die

⁶⁰ Metabion, Martinsried

⁶¹ Biometra GmbH, Göttingen

⁶² Owl Separation Systems, Rochester, USA

Probentaschen. Nach Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit TAE-Puffer befüllt und je 20 µl der PCR-Produkte mit 4 µl Loading Dye(6x)⁶³ gemischt. Die so gefärbten Ansätze wurden neben einer DNA-Leiter (Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder)⁶³ in die Probentaschen pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 80 Volt für ca. 30 min. Anschließend wurden die Gele im Fusion Imager⁶⁴ unter UV-Licht entwickelt.

3.8 Immunzytologie

3.8.1 Puffer und Lösungen

Permeabilisierungslösung

BD Cytofix/Cytoperm⁶⁵, gebrauchsfertig

Waschpuffer für permeabilisierte Zellen

BD Perm/Wash ⁶⁵	5,00 ml
Aqua dest.	45,00 ml

PFA-Fixierlösung 4%

Paraformaldehyd ⁶⁶ (4%)	40,00 g
PBS (siehe 3.2.1)	800,00 ml

Eine Stunde unter Rühren bei 60°C lösen und anschließend im Eisbad abkühlen lassen. Dann das Volumen mit PBS auf 1000 ml auffüllen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI⁶⁷, gesättigte Lösung

⁶³ Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

⁶⁴ Vilber Lourmat, Eberhardzell

⁶⁵ Becton Dickinson, Heidelberg

⁶⁶ Merck, Darmstadt

⁶⁷ Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.8.2 Immunzytologische Färbung

Für die immunzytologische Färbung der PBMC wurden je 2×10^5 Zellen pro Delle in einer 96-Loch Rundbodenplatte⁶⁸ in 50 µl PBS ausgesät und abzentrifugiert (800 rcf, 1 min, 4°C). Da der verwendete primäre Antikörper gegen den C-Terminus des μ -Opioidrezeptors gerichtet ist und sich diese Domäne des Rezeptors intrazellulär befindet, mussten die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden. Nach schwungvollem Dekantieren des PBS-Überstandes wurden die Zellen mit 100 µl/Delle Permeabilisierungslösung versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit einem Waschpuffer für permeabilisierte Zellen wurde der erste Färbeschritt vorgenommen. Der verwendete Antikörper wurde im Kaninchen gegen eine Peptidsequenz des intrazellulären C-Terminus des MOR erzeugt⁶⁹. Die Sequenz ist identisch bei Mensch, Ratte, Maus, Katze und Schwein. Beim Rind ist die vierte Position der Aminosäuresequenz verändert. Zur Färbung wurden 30 µl des Antikörpers gegen den MOR⁶⁹ (1:100 verdünnt in PBS) zugegeben. Als entsprechende Isotypkontrolle wurde Kaninchenserum (1:10⁹ verdünnt in PBS) verwendet. Die Platte wurde 30 min auf Eis inkubiert und danach wieder mit 170 µl PBS pro Delle gewaschen. Nun erfolgte der zweite Färbeschritt mit je 30 µl des sekundären Antikörpers pro Delle, der gegen den Wirt des ersten Antikörpers (Kaninchen) gerichtet war. Es wurde ein anti-Kaninchen IgG (H+L) -Antikörper aus der Ziege verwendet, der mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa 488 konjugiert war⁷⁰ (1:500 verdünnt in PBS). Auch dieser Antikörper wurde 30 min auf Eis auf den Zellen belassen. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 170 µl PBS. Nun wurden die Zellen in 150 µl PBS resuspendiert und 50 µl einer 4% PFA-Fixierlösung zugegeben (Endkonzentration PFA 1%). Die Fixierung erfolgte ebenfalls auf Eis für 30 min. Zuletzt wurden 2 µl/Delle einer gesättigten DAPI-Lösung (1:100) zugegeben und jede Delle gut resuspendiert. Nach einer letzten Inkubation von 20 Minuten wurde die Suspension mit den gefärbten Zellen in einer speziellen Trocken-Zyto-Zentrifuge⁷¹ auf Objektträger zentrifugiert (5 min, 1000 U/min). Diese wurden dann mit Fluoromount Medium⁷² mit Objektgläsern eingedeckelt und im Kühlschrank einige Tage trocknen gelassen. Die Auswertung der gefärbten PBMC

⁶⁸ Sarstedt, Nümbrecht

⁶⁹ Herr, Prof. Dr. Ammer, Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, LMU München

⁷⁰ Thermo Fisher Scientific, Schwerte

⁷¹ Hettich, Tuttlingen

⁷² Serva, Heidelberg

erfolgte mit einem Leica DMI8 Mikroskop⁷³ und der dazugehörigen LAS-X-Software⁷³.

3.9 Durchflusszytometrie und Analyse

3.9.1 Puffer und Lösungen

RPMI Gebrauchsmedium

siehe Kapitel 3.4.1

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

siehe Kapitel 3.2.1

Vitalitätsmarker

Lyophilisiertes Viability Fixable Dye⁷⁴

In 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)⁷⁵ lösen und bei - 20°C bis zur Verwendung lagern

Permeabilisierungslösung

BD Cytotfix/Cytoperm⁷⁶, gebrauchsfertig

Waschlösung für permeabilisierte Zellen

BD Perm/Wash⁷⁶ 25,00 ml

Ad 250 ml Aqua dest.

PFA-Fixierlösung 4%

siehe Kapitel 3.8.1

⁷³ Leica, Wetzlar

⁷⁴ Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

⁷⁵ Serva, Heidelberg

⁷⁶ Becton Dickinson, Heidelberg

3.9.2 Antikörper

Folgende primäre Antikörper wurden zur Phänotypisierung der porcinen B- und T-Lymphozyten sowie zur Untersuchung der Expression des μ -Opioidrezeptors (MOR) eingesetzt:

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft	Verdünnung
eOPRM1	polyklonal	Kaninchen IgG	Prof. Dr. H. Ammer, LMU München	1:100
Anti-human-CD79 α	HM57	Maus IgG1	Bio-Rad, Feldkirchen	1:100
Anti-human-CD3 ϵ Alexa Fluor 488	CD3-12	Ratte IgG1	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper	Wirtsspezies	Herkunft	Verdünnung
Anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	1:500
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor 647	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	1:500

3.9.3 Fluoreszenzfärbung von porcinen PBMC

Mittels Durchflusszytometrie können einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen aufgrund ihrer lichtstreuenden und fluoreszierenden Eigenschaften analysiert und phänotypisiert werden. Die gewonnenen PBMC (siehe Kapitel 3.2.3) wurden zunächst 48 Stunden lang in 12-Well-Platten⁷⁷ kultiviert. Anschließend wurden die verschiedenen stimulierten Zellen abzentrifugiert und die Zellpellets für die Vitalitätsbestimmung bis zu einer Gesamtzellzahl von 1×10^7 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von je 1 μ l Viobility 405/520 Fixable Dye⁷⁸ wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden

⁷⁷ Sarstedt, Nümbrecht

⁷⁸ Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

die Zellen mit 1 ml Waschpuffer (BD Perm/Wash)⁷⁹ versetzt und gewaschen (4°C, 500 rcf, 10 min). Es folgte das Aussäen der Zellen zu je 4×10^5 Zellen in 50 µl PBS pro Delle in 96-Well-Rundbodenplatten⁷⁷. Nach Zentrifugation der Zellen (4°C, 800 rcf, 1 min) und Dekantieren der Flüssigkeit erfolgte die Fluoreszenzfärbung mit den Antikörpern (siehe Tabelle in Kapitel 3.9.2). Hier wurde durchgehend auf Eis und im abgedunkelten Raum gearbeitet. Für jeden Färbeschritt wurden die Zellen mit dem jeweiligen Antikörper 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal in PBS bzw. nach erfolgter Permeabilisierung der Zellen zur Detektion intrazellulärer Epitope mit BD Perm/Wash gewaschen. Nach Färbung mit unkonjugierten primären Antikörpern wurde ein zusätzlicher Färbeschritt mit dem jeweils passenden fluorochrommarkierten, sekundären Antikörper durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen mit PFA-Lösung (1%) fixiert (Inkubation für 20 min auf Eis) und danach direkt oder am nächsten Tag durchflusszytometrisch analysiert.

3.9.4 Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurde ein MACSQuant Analyzer 10⁸⁰ verwendet. Mithilfe der Durchflusszytometrie kann die Proteinexpression einzelner Zellen und Zellpopulationen, die zuvor mit einem Antigen-spezifischen, fluorochrom-markierten Antikörper gefärbt wurden, quantitativ bestimmt werden. Der Prozentsatz der Zellen, die dieses Antigen exprimieren, kann somit ermittelt werden. Durch Doppelfärbungen mit dem MOR-Antikörper (eOPRM1) und den Leukozyten-Differenzierungsmarkern für T- (CD3) und B-Zellen (CD79α) untersuchten wir, welche Subpopulationen der PBMC den MOR exprimieren.

3.9.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mithilfe der Flowlogic Software⁸⁰. Die angewendete Gating-Strategie ist in Abbildung 3.1 exemplarisch dargestellt. Zunächst wurden alle gemessenen Zellen durch Auftragen der Forward-Scatter-Fläche (FSC-A, Größe der Zellen) gegen die Forward-Scatter-Höhe (FSC-H,

⁷⁹ Becton Dickinson, Heidelberg

⁸⁰ Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Höhe der Zellen) angezeigt. Es wurden lediglich Zellen ausgewählt, die für beide Parameter den gleichen Wert aufwiesen, um zu gewährleisten, dass nur einzeln detektierte Zellen (Singlets) in die Auswertung einbezogen werden. Aus diesen Zellen wurden danach mithilfe des Vitalitätsmarkers Viability 405/520⁸⁰, mit dem die Zellen zuvor gefärbt wurden, die vitalen Zellen ausgewählt. Nur die Zellen, die den Farbstoff nicht aufgenommen hatten und demnach noch eine intakte Zellmembran aufwiesen, wurden weiter beurteilt. Im nächsten Schritt wurde anhand der für Lymphozyten typischen Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) die Population dieser Zellen bestimmt. Nur für diese Zellen wurden die Einzelfärbungen mithilfe eines Histogramms und die Doppelfärbungen mithilfe eines Dotplots ausgewertet. Anhand der Histogramme konnte eine positive Fluorochrom-markierte Population auf der rechten Seite der Trennlinie von einer negativen Population auf der linken Seite unterschieden werden. Im Dotplot wurden vier Quadranten ausgewertet, wobei doppelt positive Zellen, die mit dem eOPRM1-Antikörper und mit dem jeweiligen Subpopulationsmarker angefärbt wurden, im rechten oberen Quadranten lagen. Für die positive Population wurden die Werte des prozentualen Anteils aller Zellen, bei denen eine Antikörper-Bindung detektiert wurde, im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ermittelt.

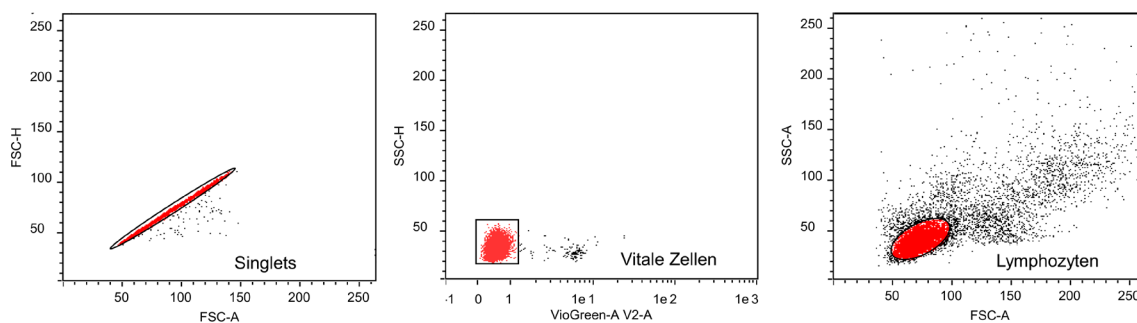


Abb. 3.1 Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse porciner PBMC

Die Grafik zeigt exemplarisch die Gating-Strategie mit der die PBMC analysiert wurden. In der linken Abbildung sind alle Zellen im FSC-A/FSC-H Dotplot dargestellt. Einzelne Zellen (Singlets) zeichnen sich durch einen linearen Zusammenhang zwischen FSC-A und –H aus und wurden anhand dessen ausgewählt. Die rot gefärbten Zellen wurden im nächsten Plot aufgetragen und danach bewertet, ob sie den Vitalitätsmarker Viability 405/520 Fixable Dye aufgenommen haben. Nur die vitalen Zellen, die nicht mit dem Farbstoff angefärbt wurden (Zellmembran noch intakt), wurden für die weitere Analyse herangezogen (mittlere Abbildung). Aus den vitalen Zellen wurde im rechten Dotplot anhand der für sie typischen Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) die Lymphozytenpopulation eingegrenzt. Diese Zellen wurden letztendlich beurteilt.

3.10 Immunhistochemie

3.10.1 Puffer und Lösungen

Bouin'sche Lösung

Bouin's Solution⁸¹, gebrauchsfertig

EDTA-Puffer

EDTA⁸² (100 mM) 29,22 g

In 1000 ml Aqua dest. lösen und pH auf 8,0 einstellen

PBS-Tween-Lösung (PBS-T)

Tween-20⁸² (0,05%) 0,50 ml

In 1000 ml PBS (Kap. 3.2.1) lösen

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,4

Tris⁸³ (30 mM) 3,60 g

NaCl⁸² (150 mM) 8,80 g

In 1000 ml Aqua dest. lösen und pH auf 7,4 einstellen.

TBS-Tween-Lösung (TBS-T)

Tween-20⁸² (0,05%) 0,50 ml

In 1000 ml TBS lösen.

Lösung zur Antikörperverdünnung

BSA⁸² (1%) 0,01 ml

In 100 ml TBS-T lösen.

Blockadelösung

Ziegenserum (5%) 0,05 ml

BSA⁸² (1%) 0,01 ml

In 100 ml TBS-T lösen.

⁸¹ Sigma Aldrich, Taufkirchen

⁸² Applichem, Darmstadt

⁸³ Carl Roth, Karlsruhe

3.10.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Die entnommenen Organproben wurden mit Bouin'scher Lösung⁸⁴ für 72 Stunden fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dies erfolgte für je 24 h in Ethanol⁸⁵ mit 70, 96 und 99%, Isopropanol⁸⁵ und Xylol⁸⁵. Vor der Einbettung wurden die Schnitte für jeweils 24 h in flüssigem Paraffin 1,3,6 und 9⁸⁶ gelagert. Dann wurden sie in Paraffin 9 eingebettet und ausgehärtet. Mit einem Rotationsmikrotom (HM360)⁸⁷ wurden aus den paraffinierten Organproben Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt und auf Objektträger gezogen. Um ein Ablösen der histologischen Präparate während der immunhistochemischen Färbung zu verhindern, wurden die Objektträger 72 h lang bei 39°C getrocknet. Danach wurden sie in Sammelboxen bis zur Verwendung gelagert.

3.10.3 Entparaffinieren der Paraffinschnitte

Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Dies erfolgte zweimal für 5 min in Xylol, jeweils 5 min in Isopropanol, 99% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol und schließlich 10 min in Aqua dest. Anschließend wurden durch die Paraffinierung maskierte Proteinepitope durch 15-minütiges Kochen in EDTA-Puffer wieder freigelegt (Demaskierung). Dieser Schritt ist wichtig, damit die Bindungsstellen für Antikörper an den Strukturen wieder frei werden. Die Schnitte wurden dann 10 min im Eisbad abgekühlt und zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Nun wurden die histologischen Präparate auf den Objektträgern mit einem Fettstift (Delimiting Pen)⁸⁸ umrandet, um ein späteres Verlaufen der Antikörperlösung zu verhindern. Nach kurzem Antrocknen wurden die Schnitte 15 min in PBS-T umgepuffert.

⁸⁴ Sigma Aldrich, Taufkirchen

⁸⁵ CLN, Freising

⁸⁶ Thermo Fisher Scientific, Schwerte

⁸⁷ Microm, Walldorf

⁸⁸ DAKO, Hamburg

3.10.4 Immunhistochemische Färbung

Zu Beginn wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 40 min mit einer Blockadelösung aus TBS-T mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 5% Ziegenserum bedeckt. Dieser Schritt diente der Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe. Nach Abklopfen der Blockadelösung erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (OPRM1-Antikörper⁸⁹ in PBS-T + 1% BSA verdünnt) über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer. Der verwendete primäre Antikörper richtet sich gegen den C-Terminus des MOR. Er wurde im Kaninchen hergestellt und ist reaktiv gegen den MOR von Mensch, Ratte, Maus, Katze und Schwein, da die Sequenz der antikörperbindenden Domäne bei diesen Spezies identisch ist. Jeweils ein Schnitt von jedem untersuchten Organ wurde als Isotypkontrolle mit Kaninchenserum (1:100.000 verdünnt in PBS-T mit 1% BSA) inkubiert. Am nächsten Tag wurden drei Waschschrte in PBS-T zu je 5 min durchgeführt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper⁹⁰ (gelöst in TBS-T mit 1% BSA) für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Folgende Antikörper kamen zum Einsatz:

Antikörper	Wirt	Typ	Firma/Herkunft	Verdünnung
eOPRM1	Kaninchen	polyklonal	Prof. Dr. Ammer, LMU München	1:100
Anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Ziege	polyklonal	ThermoFisher Scientific, Schwerte	1:500

Die Kernfärbung wurde mit DAPI⁹⁰ durchgeführt. Die Schnitte wurden dreimal für je 5 min in PBS-T gewaschen und abschließend mit Fluoromount Medium⁹¹ und 22 x 22 mm Deckgläsern eingedeckelt.

Nach dem Trocknen erfolgte die Beurteilung und Dokumentation der Färbungen erfolgte mit einem Leica DMI8 Mikroskop⁹² und der dazugehörigen LAS-X-Software⁹².

⁸⁹ Herr Prof. Dr. Ammer, Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, LMU München

⁹⁰ Thermo Fisher Scientific, Schwerte

⁹¹ Serva, Heidelberg

⁹² Leica, Wetzlar

4 ERGEBNISSE

4.1 Veränderungen der Proliferationsrate porciner PBMC durch BCM-7

4.1.1 Vergleich der Wirkung von A1- und A2-Milch

Um die Auswirkungen von BCM-7 auf die Immunreaktion des Schweins näher zu charakterisieren, untersuchten wir welchen Einfluss es auf die Proliferation von porcinen Immunzellen hat. Dazu verglichen wir zunächst die Wirkung roher und verdauter A1- und A2-Milch auf die Proliferationsrate porciner PBMC. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Milchsorten ist die Menge an BCM-7, die aus dem Beta-Casein während der enzymatischen Verdauung entsteht (Jinsmaa et al. 1999; Asledottir et al. 2018). Also stellten wir die Hypothese auf, dass man einen Unterschied zwischen der Zugabe verdauter A1- und A2-Milch sehen müsste, wenn BCM-7 Auswirkungen auf die Proliferationsrate hat. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Milchproben von zwei Kühen, die jeweils reinerbig für das Merkmal A1- oder A2-Casein waren, *in vitro* verdaut. Dann wurden sie im Proliferationsassay vergleichend mit den unverdauten Milchproben angewendet.

Die Zugabe der rohen Milch führte, im Vergleich zur Kontrolle, zu einer hochsignifikanten Hemmung der Proliferation ConA-stimulierter porciner PBMC (**** $p \leq 0,0001$). Ein Unterschied zwischen A1- und A2-Milch war jedoch dabei nicht vorhanden. Die verdauten Milch hatte ebenfalls eine signifikant hemmende Wirkung auf die Proliferation. Diese war signifikant schwächer ausgeprägt als die durch rohe Milch verursachte Hemmung. Allerdings konnten wir auch nach Zugabe der verdauten Milch keinen Unterschied zwischen der Wirkung von A1- und A2-Milch feststellen.

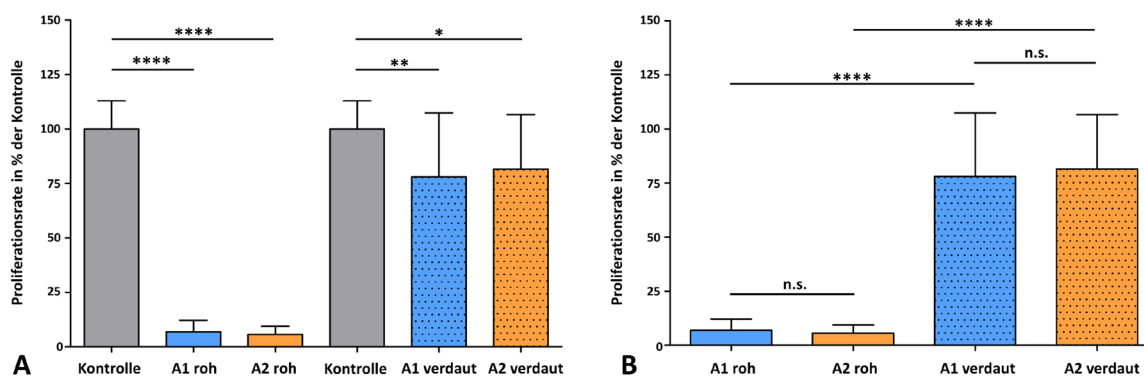


Abb. 4.1: Hemmung der Proliferation porciner PBMC durch A1- und A2-Milch

Dargestellt ist die mittlere Proliferationsrate ConA-stimulierter porciner PBMC, die mit 0,5% A1- (blaue Säulen) bzw. A2-Milch (orangene Säulen) behandelt wurden (n=6). Die planen Säulen zeigen die Proliferationsrate der Zellen nach Zugabe roher Milch, die gepunkteten Säulen die nach Zugabe von *in vitro* verdauter Milch. Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der stimulierten, mit Milch behandelten Zellen und den cpm-Werten der Kontrolle (graue Säule, nur mit ConA (1 µg/ml) stimulierte Zellen; entspricht durch diese Berechnung immer 100%). Die rohen Milchproben hemmten die Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrolle gleichermaßen und signifikant (A; **** $p \leq 0,0001$). Die verdauten Milchproben hemmten die Proliferation der Zellen ebenfalls signifikant (A; A1-Milch: ** $p \leq 0,01$; A2-Milch: * $p \leq 0,05$), aber deutlich schwächer als die rohe Milch. Die Proliferationsraten mit roher und verdauter A1- bzw. A2-Milch unterschieden sich signifikant (B; **** $p \leq 0,0001$). Ein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate zwischen der Zugabe von A1- und A2-Milch konnte weder im rohen, noch im verdauten Zustand festgestellt werden (B).

4.1.2 Wirkung von isoliertem BCM-7

Im ersten Versuch konnten wir keinen Unterschied zwischen der Wirkung roher A1- und A2-Milch feststellen. Beide wirkten signifikant hemmend auf die Proliferation porciner PBMC. Auch nach *in vitro* Verdauung der Milch zeigte sich kein Unterschied zwischen den Proliferationsraten der Zellen unter Einfluss der beiden Milchproben. Da Milch außer BCM-7 noch andere Bestandteile enthält, die Einfluss auf die Proliferation nehmen könnten, benutzten wir im folgenden Versuch reines BCM-7, um dessen Wirkung isoliert zu untersuchen. Die Zellen wurden wieder 48 Stunden lang mit dem Mitogen ConA stimuliert. Gleichzeitig wurde BCM-7 in verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

BCM-7 bewirkte ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml eine signifikante Hemmung der Proliferation porciner PBMC (* $p \leq 0,05$). In niedrigeren Konzentrationen hatte es keine signifikante Wirkung. Um zu untersuchen ob diese Wirkung über Opioidrezeptoren vermittelt wird, wurde im nächsten Versuch zusätzlich Naloxon als Opioid-Antagonist eingesetzt.

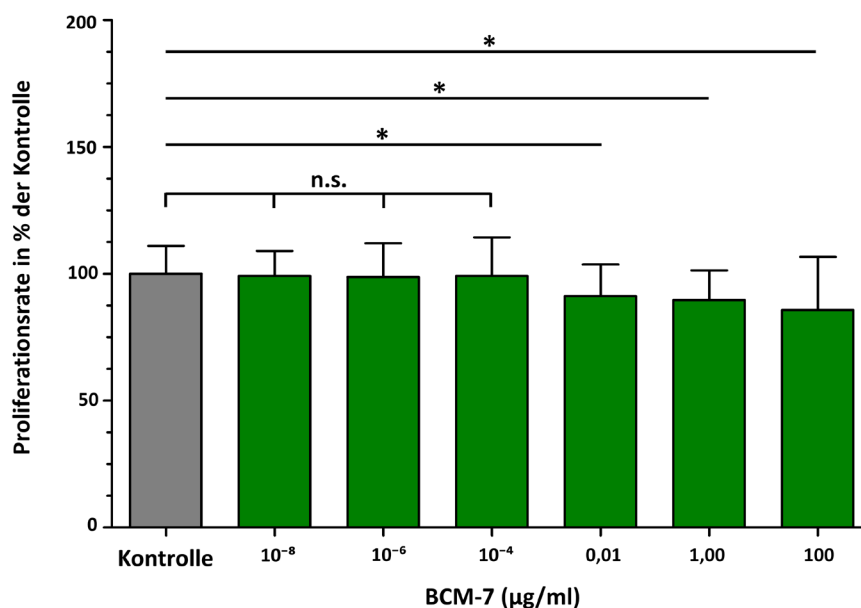


Abb. 4.2: Hemmung der Proliferationsrate porciner PBMC durch BCM-7

Dargestellt ist die mittlere Proliferationsrate der ConA-stimulierten und mit BCM-7 behandelten Zellen (grüne Säulen) im Vergleich zur Kontrolle (graue Säule), die nur mit ConA (1 µg/ml) stimuliert wurde (n=8). Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der mit ConA stimulierten, mit BCM-7 behandelten Zellen und den Werten der Kontrolle (nur mit ConA stimulierte Zellen). Der Faktor der Kontrolle entspricht durch diese Berechnung immer 100%. Die niedrigen Konzentrationen BCM-7 von 10⁻⁸ bis 10⁻⁴ µg/ml hatten keine Wirkung auf die Proliferation der porcinen PBMC. Die höheren Konzentrationen an BCM (0,01 µg/ml bis 100 µg/ml) hemmten die Proliferationsrate signifikant (* $p \leq 0,05$).

4.1.3 Einfluss von Naloxon als Antagonist zu BCM-7

Das Ziel des folgenden Versuches war es zu prüfen, ob die beobachtete Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation der PBMC an Opioidrezeptoren vermittelt wird.

Da Beta-Casomorphine vorwiegend an µ-Opioidrezeptoren wirken (Koch et al. 1985; Zoghbi et al. 2006), setzten wir Naloxon als spezifischen Inhibitor ein. Naloxon wirkt

an allen Opioidrezeptortypen (μ , κ und δ) antagonistisch, die höchste Affinität besitzt es jedoch zu μ -Opioidrezeptoren (Singh et al. 2020). Es inhibiert somit die Wirkung von opioiden Substanzen, sofern diese Wirkung direkt über die entsprechenden Opioidrezeptoren vermittelt wird (Singh et al. 2020). Die Zellen wurden im Proliferationsassay erneut mit ConA stimuliert und mit BCM-7 und Naloxon behandelt. BCM-7 verwendeten wir hierbei in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$, da es in dieser Konzentration eine signifikante Wirkung auf die Proliferation der Zellen hatte. Naloxon wurde eine Zehnerpotenz höher konzentriert zugegeben, um eine sichere Inhibition zu gewährleisten. Die alleinige Zugabe von Naloxon in einer Konzentration von 10 μM hemmte die Proliferation der Zellen bereits signifikant im Vergleich zur Kontrolle (** $p \leq 0,001$). Die erwartete Aufhebung der durch BCM-7 (1 $\mu\text{g/ml}$) bewirkten Hemmung der Proliferation durch Naloxon, konnte dagegen nicht beobachtet werden. Im Gegenteil zeigte sich durch die gleichzeitige Zugabe von BCM-7 und Naloxon eine signifikant stärkere Hemmung der Proliferationsrate als nur mit BCM-7 alleine (* $p \leq 0,05$). Diese Hemmung durch Naloxon wollten wir näher charakterisieren. Dazu stimulierten wir die Zellen mit verschiedenen anderen Mitogenen und untersuchten im weiteren Verlauf auch die Wirkung von Naloxon in Verbindung mit anderen Opioidliganden.

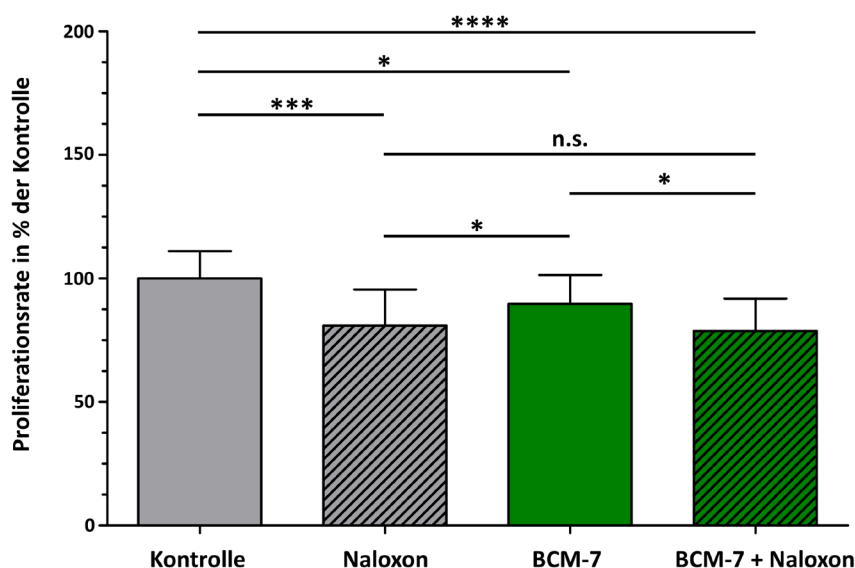


Abb. 4.3: Beeinflussung der Proliferation porciner PBMC durch BCM-7 und Naloxon

Dargestellt ist die mittlere Proliferationsrate der ConA-stimulierten und zusätzlich mit BCM-7 (grüne Säulen; 1 µg/ml) und/oder Naloxon (gestreifte Säulen; 10 µM) behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (graue Säule), die nur mit ConA (1 µg/ml) stimuliert wurde (n=8). Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der stimulierten, behandelten Zellen und denen der Kontrolle (nur mit ConA stimulierte Zellen). Naloxon bewirkte eine signifikante Hemmung der Proliferationsrate (***) $p \leq 0,001$), die stärker als die Hemmung durch BCM-7 (1 µg/ml) war. Die gleichzeitige Zugabe von BCM-7 und Naloxon (grüne, gestreifte Säule) wirkte signifikant stärker hemmend auf die Proliferation als die alleinige Verwendung von BCM-7 (* $p \leq 0,05$).

4.1.4 Wirkung von BCM-7 und Naloxon mit verschiedenen Lektinen

Nach der Stimulation mit ConA zeigten die porcinen PBMC eine signifikant verringerte Proliferationsrate unter Einfluss von BCM-7 und Naloxon (siehe Kapitel 4.1.3). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Wirkung nur bei Stimulation der Zellen mit ConA auftritt, wendeten wir weitere mitogen wirkende Lektine im Proliferationsassay an. Tatsächlich konnten wir feststellen, dass BCM-7 (1 µg/ml) und Naloxon (10 µM) nur in Verbindung mit ConA eine signifikante Wirkung auf die Proliferation der Zellen hatten (siehe Kapitel 4.1.3). Mit den Mitogenen Bananen-Lektin (BanLec), Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed-Mitogen (PWM) hatte weder BCM-7 noch Naloxon in der verwendeten Konzentration einen signifikanten Effekt auf die porcinen Zellen.

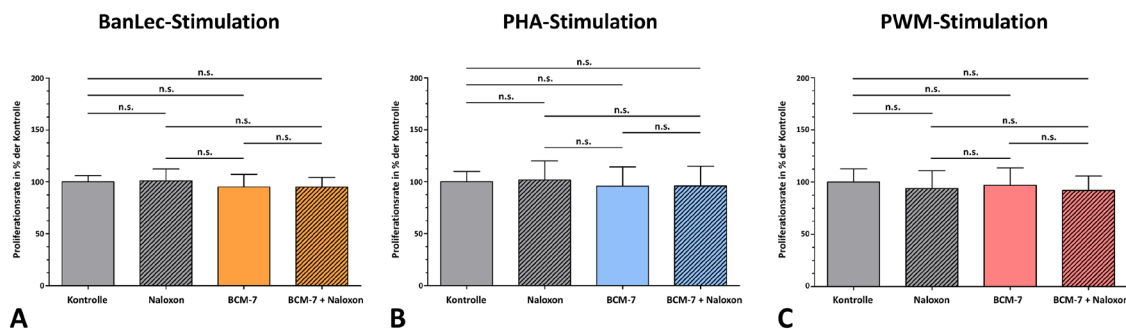


Abb. 4.4: Beeinflussung der Proliferation porciner PBMC durch BCM-7 und Naloxon in Verbindung mit verschiedenen Lektinen

Dargestellt ist jeweils die mittlere Proliferationsrate der BanLec- (A), PHA- (B) und PWM-stimulierten (C) und zusätzlich mit BCM-7 (plane, farbige Säulen; 1 µg/ml) und/oder Naloxon (gestreifte Säulen; 10 µM) behandelten porcinen PBMC im Vergleich zur Kontrolle (plane, graue Säulen), die nur mit dem jeweiligen Lektin (BanLec und PWM 1 µg/ml; PHA 5 µg/ml) stimuliert wurde (n=8). Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der stimulierten, behandelten Zellen und denen der Kontrolle (nur mit ConA stimulierte Zellen). Weder BCM-7 noch Naloxon zeigten eine signifikante Wirkung in Verbindung mit den verschiedenen Lektinen.

4.2 Effekt von selektiven Opioiden auf die Proliferation porciner PBMC

4.2.1 Vergleich der Wirkung selektiver Opioidliganden

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss von vier verschiedenen selektiven Opioiden auf die Proliferation der porcinen PBMC untersucht. Dies diente einerseits dazu, die hemmende Wirkung von Naloxon näher zu untersuchen und andererseits wollten wir die Wirkung der Liganden mit der von BCM-7 vergleichen. Als µ-selektive Liganden wurden Morphin und DAMGO verwendet sowie jeweils ein κ-selektiver (U69,593) und ein δ-selektiver Ligand (Deltorhin II). Die Zellen wurden mit ConA (1 µg/ml) für 48 Stunden stimuliert und zusätzlich mit den verschiedenen Opioidliganden behandelt. Keiner der verwendeten Opioidliganden hatte eine signifikante Wirkung auf die Proliferation der porcinen PBMC.

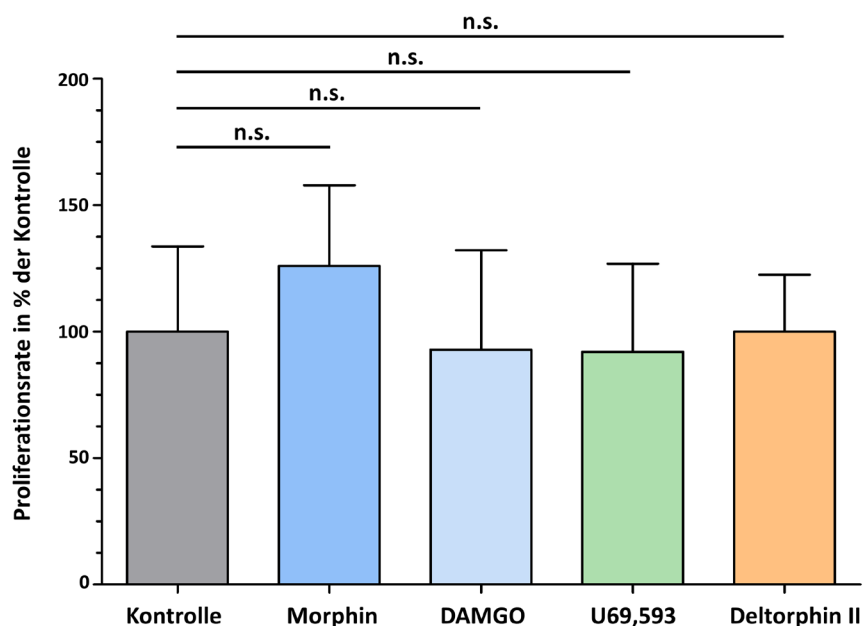


Abb. 4.5: Proliferation porciner PBMC beeinflusst durch verschiedene selektive Opioidliganden

Dargestellt ist jeweils die mittlere Proliferationsrate der ConA-stimulierten und zusätzlich mit den Opioidliganden Morphin (10 μ M), DAMGO (1 μ M), U69,593 (1 μ M) und Deltorhin II (1 μ M) behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit ConA (1 μ g/ml) stimuliert wurde (n=5). Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der ConA-stimulierten, mit den Opioiden behandelten Zellen und denen der Kontrolle (nur mit ConA stimulierte Zellen, graue Säule). Keiner der vier selektiven Liganden hatte signifikante Auswirkungen auf die Proliferation der PBMC.

4.2.2 Kombination von Naloxon mit Opioiden

Morphin ist ein Alkaloid aus dem Saft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), das fast ausschließlich an μ -Opioidrezeptoren bindet (Krishnamurti et al. 2016).

DAMGO ist ein weiterer Opioidligand, der stark selektiv für μ -Opioidrezeptoren ist (Koehl et al. 2018). Diese beiden Liganden wurden vergleichend mit BCM-7 verwendet, da dieses ebenfalls vorwiegend an μ -Opioidrezeptoren bindet. Die Wirkung der Opioide wurde auch in Verbindung mit Naloxon untersucht. Weder Morphin noch DAMGO bewirkten eine signifikante Veränderung der Proliferationsrate. Auch die zusätzliche Zugabe von Naloxon veränderte die Proliferationsrate der Zellen nicht.

U69,593 ist ein Ligand, der sehr selektiv an κ -Opioidrezeptoren bindet (Zhou et al. 2015). Er veränderte die Proliferation der Zellen ebenfalls nicht signifikant, weder alleine noch in Verbindung mit Naloxon. Deltorhin II ist ein stark selektiver Ligand des δ -Opioidrezeptors (Cassell et al. 2019). Er bewirkte ebenso wie DAMGO,

Morphin und U69,593 keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate der porcinen PBMC.

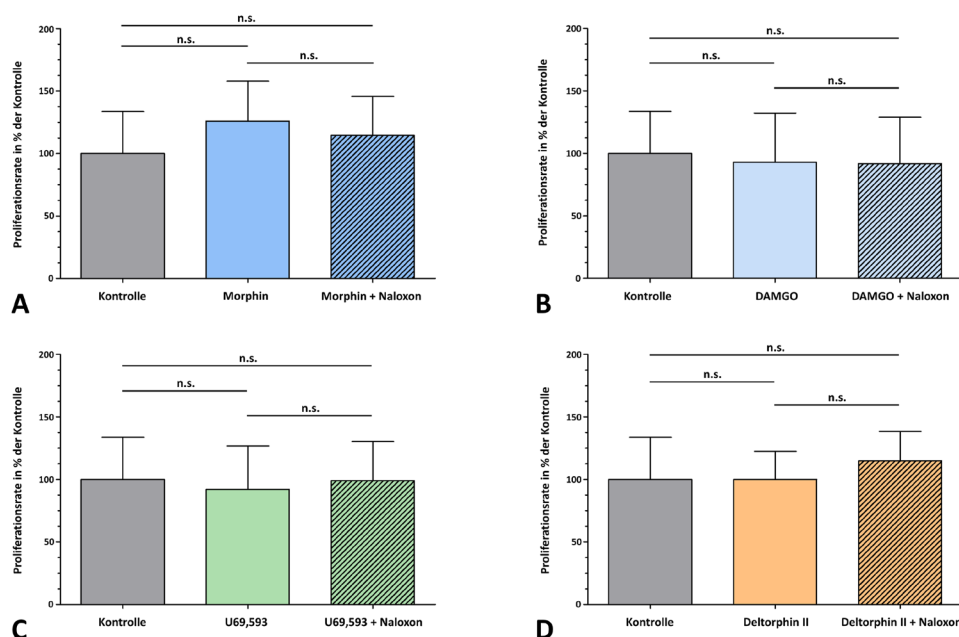


Abb. 4.6: Wirkung von Naloxon in Verbindung mit verschiedenen Opioidliganden auf die Proliferation porciner PBMC

Dargestellt ist die mittlere Proliferationsrate der ConA-stimulierten und mit verschiedenen Opioidliganden (Morphin (10 μ M), DAMGO, U69,593 und Deltorphin II (1 μ M)) sowie Naloxon (100 μ M mit Morphin/ 1 μ M mit anderen Liganden) behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit ConA (1 μ g/ml) stimuliert wurde. Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der stimulierten, behandelten Zellen und denen der Kontrolle (graue Säulen). Keiner der verwendeten Opioidliganden hatte einen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen. Die Zugabe von Naloxon (gestreifte Säulen) hatte weder zusammen mit Morphin (A) noch mit DAMGO (B), U69,593 (C) oder Deltorphin II (D) einen signifikanten Effekt auf die Proliferationsrate der porcinen PBMC.

Zusammenfassend konnten wir mit keinem der selektiven Opioidliganden eine signifikante Veränderung der Proliferation ConA-stimulierter porciner PBMC feststellen.

4.3 Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation boviner PBMC

Um herauszufinden, ob die beobachteten Effekte durch BCM-7 tierartspezifisch für das Schwein sind, führten wir einen weiteren Proliferationsversuch mit bovinen PBMC durch. Die Zellen wurden ebenfalls 48 Stunden lang mit ConA (5 μ g/ml)

stimuliert und zusätzlich wurden BCM-7 und Naloxon zugegeben. Die bovinen Zellen benötigen, unserer Erfahrung nach, eine höhere Konzentration an ConA zur Anregung der Proliferation als die porcinen Zellen. Deswegen wurde es hier mit 5 µg/ml eingesetzt. Wir verwendeten BCM-7 in der Konzentration 1 µg/ml, da diese bei den porcinen Zellen eine signifikante Hemmung der Proliferation hervorgerufen hatte (siehe Kapitel 4.1.2) und wir die Wirkung auf die Zellen der verschiedenen Spezies vergleichen wollten. Im Gegensatz zu den porcinen Zellen wurde die Proliferationsrate der bovinen PBMC durch BCM-7 in dieser Konzentration signifikant gesteigert (* $p \leq 0,05$). Naloxon (10 µM) hemmte die Proliferation der bovinen PBMC dagegen ebenfalls signifikant im Vergleich zur Kontrolle (** $p \leq 0,01$). Bei den bovinen Zellen konnte man bei der gemeinsamen Zugabe von BCM-7 und Naloxon keinen Unterschied zur Kontrolle mehr feststellen.

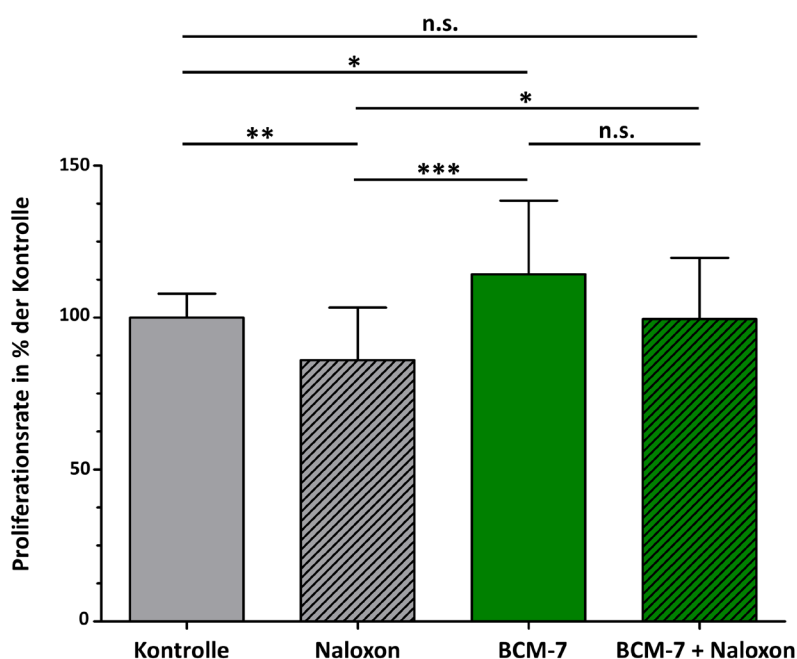


Abb. 4.7: Beeinflussung der Proliferation boviner PBMC durch BCM-7 und Naloxon

Dargestellt ist die mittlere Proliferationsrate der ConA-stimulierten und mit BCM-7 (1 µg/ml; grüne Säulen) und Naloxon (10 µM; gestreifte Säulen) behandelten bovinen PBMC im Vergleich zur Kontrolle (graue Säule), die nur mit ConA (5 µg/ml) stimuliert wurde (n=8). Die Proliferationsrate entspricht dem Quotienten aus den cpm-Werten der stimulierten, mit BCM-7 und/oder Naloxon behandelten Zellen und denen der Kontrolle. BCM-7 steigerte die Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant (grüne Säule; * $p \leq 0,05$). Naloxon dagegen verursachte eine signifikante Hemmung (graue, gestreifte Säule; *** $p \leq 0,001$). Die gleichzeitige Zugabe von BCM-7 und Naloxon (grüne, gestreifte Säule) hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Effekt auf die Zellen.

4.4 Molekularbiologischer Nachweis von Opioidrezeptoren

4.4.1 Opioidrezeptoren auf PBMC des Schweins

Da Beta-Casomorphine ihre Wirkung vorwiegend über den μ -Opioidrezeptor (MOR) entfalten und bisher noch kein Nachweis dieses Rezeptors auf porcinen PBMC erfolgt ist, war dies unser nächster Schritt.

Wir untersuchten die mRNA der porcinen PBMC auf die spezifischen Basensequenzen für die drei verschiedenen Opioidrezeptortypen (δ , κ und μ). Mittels PCR konnten wir nachweisen, dass die PBMC des Schweins die mRNA für den δ -Opioidrezeptor (DOR) enthalten, die Bande war jedoch sehr schwach ausgeprägt. Demnach ist das Ergebnis nicht ganz eindeutig. Die mRNA für den MOR und den κ -Rezeptor (KOR) konnten wir nicht nachweisen. Als Positivkontrolle wurde eine cDNA aus porcinem Hypothalamus untersucht, da dieses Gewebe alle Opioidrezeptortypen exprimiert. Das Ergebnis zeigte die drei typischen Banden für die verschiedenen Rezeptortypen in der cDNA des Hypothalamus. Die verwendeten Primer waren demnach geeignet, um das Vorhandensein der jeweiligen Nukleotidsequenz in den Zellen zu detektieren. Weiter interessierte uns, ob die polyklonale Stimulation mit ConA die Expression der Rezeptoren verändert. Das Ergebnis zeigte, dass nach 48-stündiger Stimulation mit ConA die spezifische mRNA für den DOR nicht mehr nachweisbar war. Die mRNA für die anderen Rezeptortypen (MOR und KOR) konnten wir nach der Stimulation weiterhin nicht in den Zellen finden.

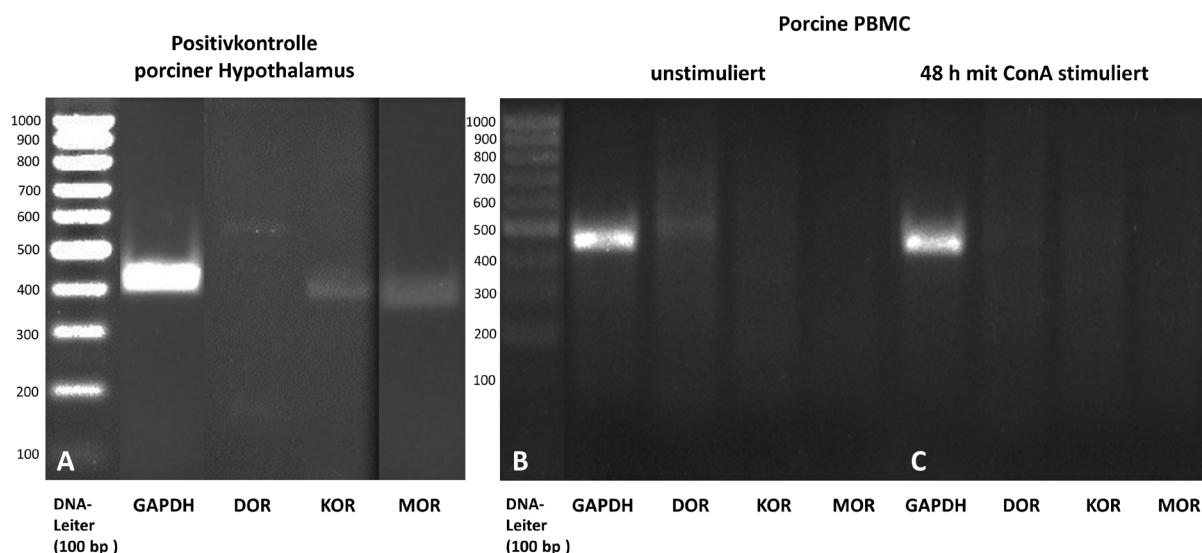


Abb. 4.8: Nachweis von spezifischer mRNA für Opioidrezeptoren in porcinen PBMC

Dargestellt ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte aus der cDNA porciner PBMC, hergestellt mit spezifischen Primern für die verschiedenen Opioidrezeptortypen (δ , κ und μ). Die Untersuchung der cDNA aus porcinem Hypothalamus (A), die hier als Kontrolle für die Primer verwendet wurde, zeigte die spezifischen Banden für den δ - (DOR), den κ - (KOR) und den μ - Opioidrezeptor (MOR). Die erwarteten Bandenlängen lagen bei: DOR 510 Basenpaare (bp), KOR 348 bp und MOR 366 bp. Die cDNA aus den unstimulierten porcinen PBMC enthielt nur die Sequenz für den DOR (B). Die Bande war relativ schwach ausgeprägt. Nachdem die Zellen 48 Stunden mit ConA (1 μ g/ml) stimuliert wurden, ließ sich in der mRNA der Zellen keiner der Opioidrezeptortypen mehr nachweisen.

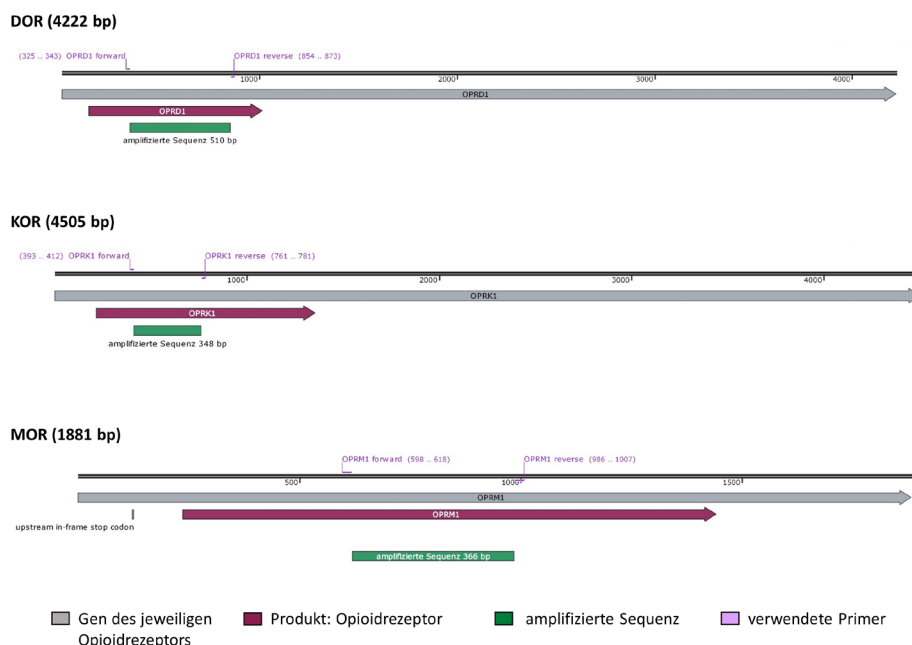


Abb. 4.9: Schema zur Darstellung der erwarteten Bandenlängen der Amplifikate für die verschiedenen Opioidrezeptortypen DOR, KOR und MOR aus der mRNA porciner Zellen

Das Schema zeigt den Zusammenhang zwischen Gen, Genprodukt und der mit den spezifischen Primern in der PCR amplifizierten Sequenz der jeweiligen porcinen Opioidrezeptortypen. Diese Analyse diente der Überprüfung der Spezifität der Banden aus porcinen Zellen (Abbildungen 4.8, 4.12 und 4.13A). Erstellt wurden die Grafiken mit dem Snap Gene Viewer (Version 4.3.5) anhand der bekannten Basensequenz für die jeweiligen porcinen Opioidrezeptortypen und mit den Sequenzen der verwendeten Primer. Für die Länge der Amplifikate wurden folgende Werte erwartet: DOR 510 Basenpaare (bp), KOR 348 bp und MOR 366 bp.

4.4.2 Opioidrezeptoren auf PBMC des Menschen

Zum Vergleich mit den porcinen PBMC untersuchten wir ebenfalls die cDNA aus humanen PBMC auf die spezifischen Nukleotidsequenzen für die verschiedenen Opioidrezeptortypen. Die Ergebnisse in der Literatur zum Vorhandensein der Sequenzen in PBMC sind kontrovers. So publizierte eine Arbeitsgruppe, dass humane CD4-positive T-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen die mRNA für den MOR enthalten (Chuang et al. 1995b). Auch die Sequenzen für den KOR und den DOR konnten in humanen T-Zellen aus peripherem Blut nachgewiesen werden (Wick et al. 1996). Aktuellere Untersuchungen brachten jedoch das gegenteilige Ergebnis, das humane PBMC keine mRNA für die drei Opioidrezeptortypen enthalten (Williams et al. 2007; Al-Hashimi et al. 2016). Aufgrund dieser kontroversen Sachlage führten wir den Nachweis erneut durch. Im Gegensatz zum Ergebnis bei den

porcinen PBMC konnten wir in den humanen PBMC nicht nur die mRNA für den DOR, sondern auch die für den MOR nachweisen. Die Bande für diesen Rezeptortyp war sehr deutlich ausgeprägt, sie war allerdings etwas länger als die, mit 246 Basenpaaren (bp) erwartete, spezifische Bande für den MOR. Die Doppelbande, die sich für den DOR im Gel zeigte, weil der verwendete Primer zwei Bindungsstellen auf der Sequenz besitzt, war in der erwarteten Länge von 331 bp nur schwach ausgeprägt. Die obere Bande bei ca. 700 bp war hingegen deutlicher ausgeprägt. Diese stellt jedoch nicht die erwartete spezifische Bande dar. Somit ist bei beiden Banden nicht ganz klar, ob es sich um die spezifischen Banden für die Opioidrezeptortypen DOR und MOR handelt. Die Sequenz für den KOR war auch in der cDNA dieser Zellen nicht auffindbar.

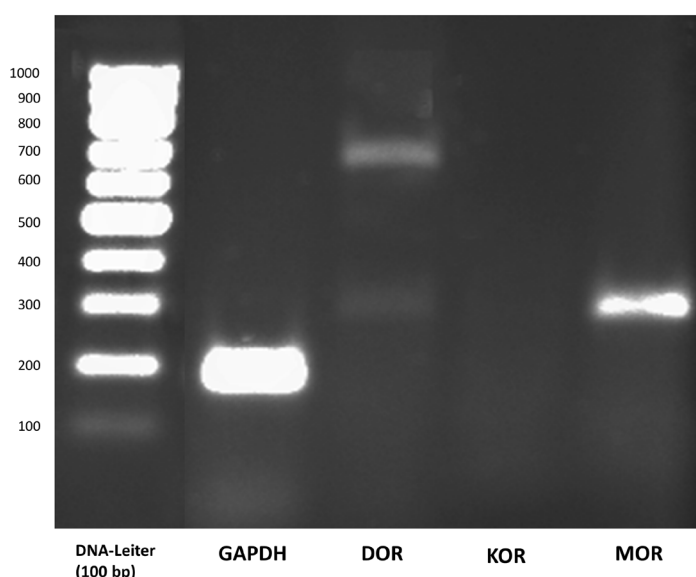


Abb. 4.10: Nachweis von spezifischer mRNA für Opioidrezeptoren in humanen PBMC

Dargestellt ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte aus der cDNA humaner PBMC. Durchgeführt wurde die PCR mit spezifischen Primern für die verschiedenen Opioidrezeptortypen des Menschen. Die erwarteten Bandenlängen lagen bei: DOR 331 Basenpaaren(bp) (DOR), 334 bp (KOR) und 246 bp (MOR). Die cDNA enthält die Sequenz für den DOR und den MOR, wobei die Bande für den MOR deutlicher ausgeprägt ist. Die Bande ist etwas länger als die erwartete Bande bei 246 bp. Die doppelte Bande beim DOR ist für die verwendeten Primer spezifisch, da der forward-Primer zwei spezifische Bindungsstellen auf der mRNA besitzt (siehe Abbildung 4.11). Die Sequenz für den KOR war in der mRNA der Zellen nicht nachweisbar.

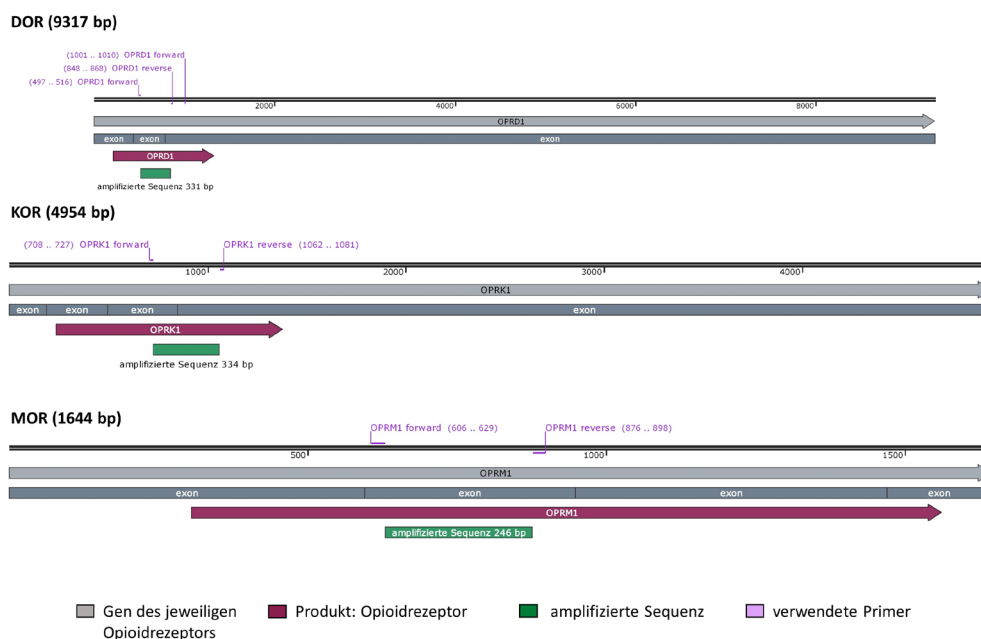


Abb. 4.11: Schema zur Darstellung der erwarteten Bandenlängen der Amplifikate für die verschiedenen Opioidrezeptortypen DOR, KOR und MOR aus der mRNA humaner Zellen

Das Schema zeigt den Zusammenhang zwischen Gen, Genprodukt und der mit den spezifischen Primern in der PCR amplifizierten Sequenz der jeweiligen Opioidrezeptortypen des Menschen. Diese Analyse diente der Überprüfung der Spezifität der Banden in den Abbildungen 4.10 und 4.13 B und C. Erstellt wurden die Grafiken mit dem Snap Gene Viewer (Version 4.3.5) anhand der bekannten Basensequenz für die jeweiligen Opioidrezeptortypen des Menschen und mit den Sequenzen der verwendeten Primer. Für die Länge der Amplifikate wurden folgende Werte erwartet: DOR 331 Basenpaare (bp), KOR 334 bp und MOR 246 bp.

4.4.3 Opioidrezeptoren auf Lymphozyten aus porcinen Peyer-Platten

Da wir im weiteren Verlauf dieses Projektes die Wirkung von BCM-7 auf porcine Peyer-Platten-Lymphozyten (PP-Lymphozyten) näher untersuchen wollen, führten wir den Opioidrezeptornachweis auch mit diesen Zellen durch. Diese Immunzellen befinden sich in der Darmwand an einer geeigneten Position, um schon sehr früh während des Verdauungsprozesses mit BCM-7 in Berührung zu kommen. Wenn BCM-7 die Funktion dieser Zellen beeinträchtigt, könnte dies bedeutsam für die Integrität der lokalen Immunität im Gastrointestinaltrakt sein. Der porcine Verdauungsapparat stellt, aufgrund einiger Ähnlichkeiten, ein sehr gutes Modell für den des Menschen dar (Brown et al. 2004). Die unstimulierten Lymphozyten aus ilealen Peyer-Platten enthielten in ihrer mRNA ebenso wie die porcinen PBMC nur

die genetische Information für den DOR. Die Bande war jedoch auch hier sehr schwach ausgeprägt und das Ergebnis demnach nicht ganz eindeutig.

Weder die Sequenz für den MOR noch für den KOR konnten wir mittels PCR nachweisen. In den Zellen, die 48 Stunden mit ConA stimuliert wurden, konnte keiner der Rezeptortypen mehr nachgewiesen werden.

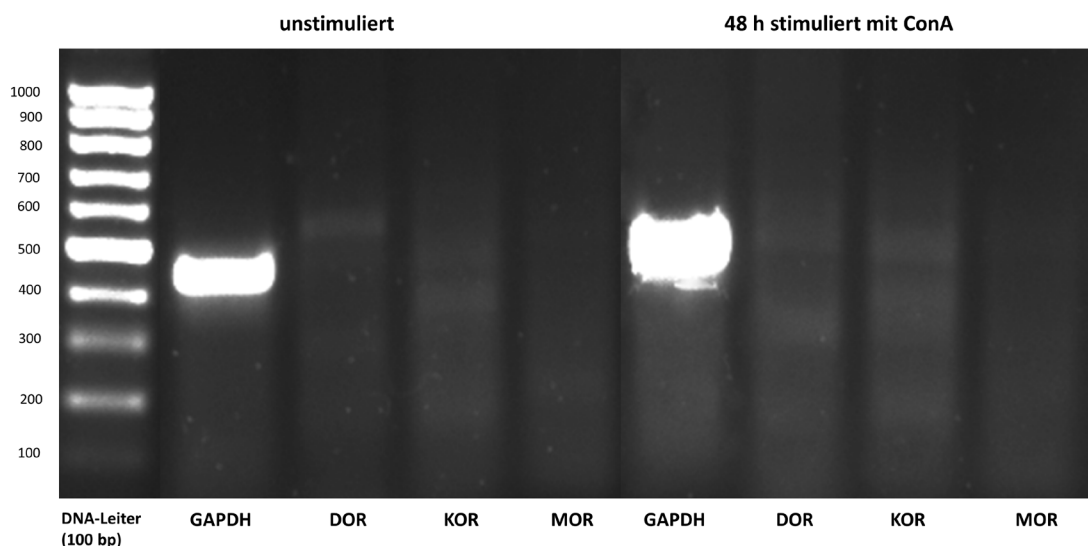


Abb. 4.12: Nachweis der spezifischen mRNA für Opioidrezeptoren in porcinen Peyer-Platten-Lymphozyten

Dargestellt ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der cDNA aus porcinen ilealen Peyer-Platten-Lymphozyten. Die cDNA wurde mit spezifischen Primern für die verschiedenen porcinen Opioidrezeptortypen hergestellt. Die erwarteten Bandenlängen betrugen: 510 Basenpaare (bp) (DOR), 348 bp (KOR), 366 bp (MOR). Die unstimulierten Lymphozyten enthielten nur die Nukleotidsequenz für den DOR. Die Bande war allerdings relativ schwach ausgeprägt. Nach 48 stündiger Stimulation mit ConA, konnte die Sequenz nicht mehr nachgewiesen werden. Die anderen Rezeptortypen waren gar nicht nachweisbar, weder in den unstimulierten noch in den stimulierten Peyer-Platten-Lymphozyten.

4.4.4 Opioidrezeptoren auf verschiedenen Darmzelllinien

Es wurden bereits verschiedene Wirkungen von Beta-Casomorphin auf die Funktion des Gastrointestinaltraktes der Ratte publiziert, wie z.B. eine Hemmung der Peristaltik im Dickdarm (Dalziel et al. 2014), eine Steigerung der Mucinproduktion im Jejunum (Trompette et al. 2003) und eine Verlängerung der gastrointestinalen Passagezeit (Barnett et al. 2014). Da der Verdauungsapparat des Schweins dem des

Menschen funktional sehr viel ähnlicher ist, als der der Ratte, interessieren uns die Wirkungen von BCM auf die Funktion des Schweinedarms. Als Vorbereitung auf zukünftige Versuche hierzu untersuchten wir eine porcine Darmzelllinie (IPEC-J2) im Vergleich mit zwei häufig verwendeten humanen Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2 und HT-29) auf das Vorhandensein von Opioidrezeptoren als potentielle Angriffsstelle für BCM. Die Untersuchung der mRNA der porcinen Darmzelllinie IPEC-J2 mittels PCR zeigte eine deutliche Bande mit der für den DOR erwarteten Bandenlänge von 510 bp. Die mRNA der Zelllinie IPEC-J2 enthält demnach den DOR. Im Gel mit den humanen Darmzelllinien zeigten sich Banden im Ansatz für den DOR und den MOR, die allerdings eine sehr ähnliche Länge hatten. Die erwarteten Bandenlängen sollten für den DOR bei 331 bp und für den MOR bei 246 bp liegen. Demnach sollten sich deutlicher unterscheiden, da auch der Längenstandard einen deutlichen Unterschied zwischen 200 und 300 bp aufweist. Deswegen ist nicht ganz klar, ob es sich um die spezifischen Banden für den DOR und den MOR handelt. Der KOR war in keiner der untersuchten Darmzelllinien nachweisbar.

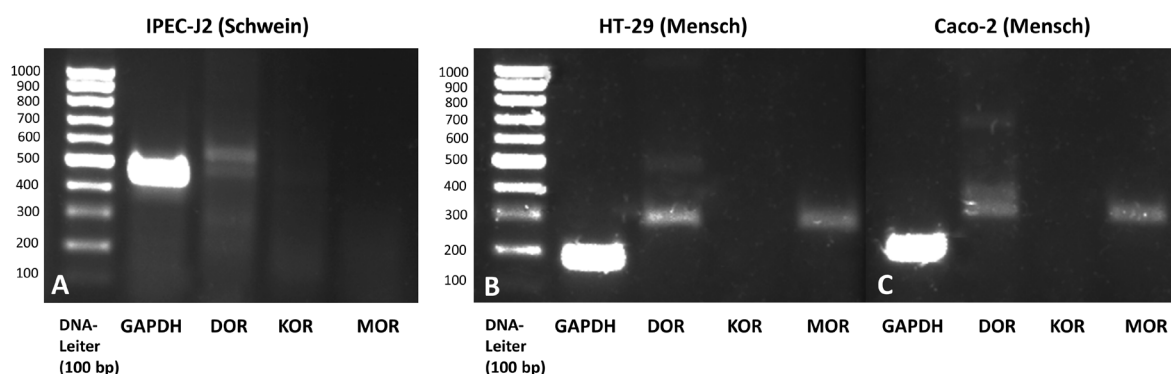


Abb. 4.13: Nachweis der spezifischen mRNA für Opioidrezeptoren in verschiedenen Darmzelllinien

Dargestellt ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der cDNA aus der porcinen Darmzelllinie IPEC-J2 (A) sowie aus zwei humanen Darmzelllinien, Caco-2 (B) und HT-29 (C). Die erwarteten Bandenlängen für porcine Zellen betrugen: 510 Basenpaare (bp) (DOR), 348 bp (KOR), 366 bp (MOR) (siehe Abb. 4.9). Für humane Zellen wurden folgende Bandenlängen erwartet: 331 bp (DOR), 334 bp (KOR), 246 bp (MOR) (siehe Abb. 4.11). In der cDNA der porcinen Darmzelllinie konnten wir nur die spezifische Sequenz für den DOR nachweisen. Bei den beiden humanen Darmzelllinien erhielten wir deutliche Banden, sowohl für den DOR, als auch für den MOR. Die doppelte Bande beim DOR ist für die verwendeten Primer spezifisch, da der forward-Primer zwei spezifische Bindungsstellen auf der mRNA besitzt (siehe Abbildung 4.11). Die Banden für DOR und MOR wiesen jedoch eine ähnliche Länge auf, sie sollten sich deutlicher unterscheiden. Der KOR war weder in der porcinen, noch in den humanen Darmzelllinien nachweisbar.

4.5 Immunzytologischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors

4.5.1 Nachweis auf porcinen PBMC

RNA ist recht anfällig für den Abbau durch ubiquitär vorhandene Enzyme und es ist möglich, dass wir in den porcinen PBMC den MOR nicht nachweisen konnten, weil die Menge an spezifischer mRNA sehr gering war oder sie während der Präparation abgebaut wurde. Aus diesem Grund führten wir zur Bestätigung des Ergebnisses eine immunzytologische Färbung der Zellen mit einem spezifischen Antikörper durch, der an eine Domäne des MOR bindet.

Die Färbung zeigte eindeutig, dass einige Zellen aus der Population der porcinen PBMC den MOR ausprägen.

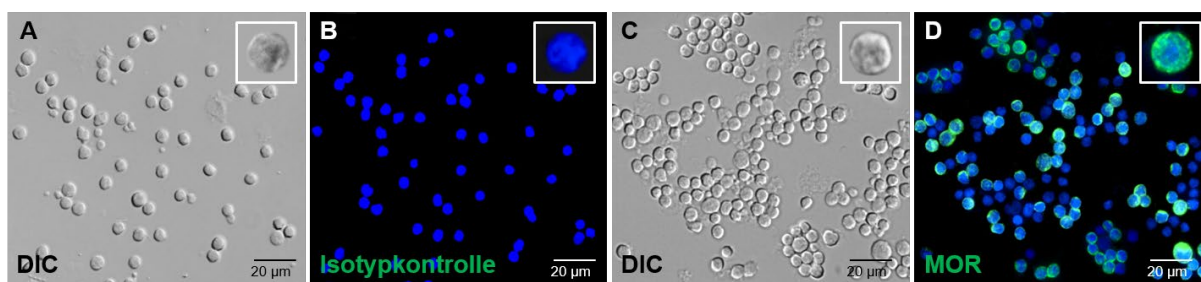


Abb. 4.14: Immunzytologischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors auf porcinen PBMC

Die differentielle Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) zeigt jeweils die PBMC der Isotypkontrolle (A) bzw. die mit dem MOR-Antikörper gefärbten porcinen PBMC (C). Die Zellen der Isotypkontrolle waren negativ (B). Ein Teil der porcinen PBMC zeigte eine Expression des μ -Opioidrezeptors (grün) (D). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.5.2 Nachweis auf bovinen PBMC

Da wir bei den bovinen PBMC, gegenteilig zur signifikant hemmenden Wirkung auf porcine PBMC, eine signifikante Steigerung in der Proliferationsrate durch die Zugabe von BCM-7 beobachtet haben (siehe Kapitel 4.3), wollten wir herausfinden, ob dieser Effekt auch über den MOR vermittelt werden kann. Deshalb untersuchten wir die PBMC des Rindes ebenfalls mittels Immunzytologie auf dessen Expression. Genau wie bei den porcinen PBMC, konnten wir auch hier auf einer Teilpopulation der PBMC die Ausprägung des MOR nachweisen. Die Intensität des Signals variierte zwischen den Zellen.

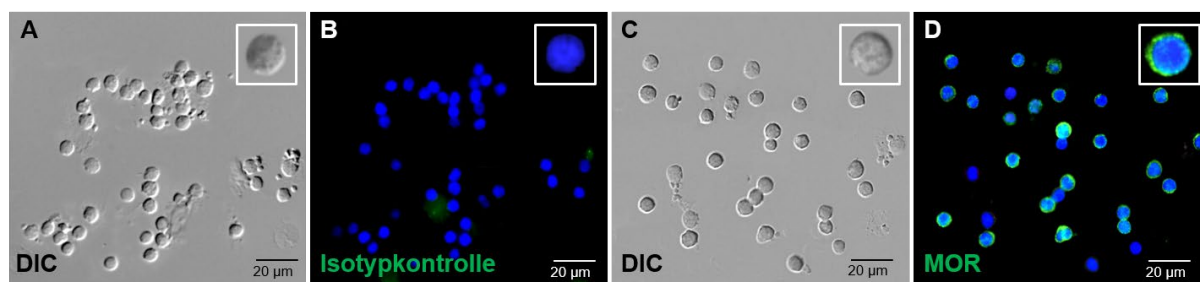


Abb. 4.15: Immunzytologischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors auf bovinen PBMC

Die DIC-Aufnahme zeigt jeweils die PBMC der Isotypkontrolle (A) bzw. die mit dem MOR-Antikörper gefärbten bovinen PBMC (C). Die Zellen der Isotypkontrolle waren negativ (B). Ein Teil der bovinen PBMC zeigt eine Expression des μ -Opioidrezeptors (grün) (D). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.5.3 Nachweis auf equinen PBMC

Zum weiteren Vergleich zwischen den Tierarten führten wir auch mit equinen PBMC eine immunzytologische Färbung zum Nachweis des MOR durch. In der Population der equinen PBMC exprimieren ebenfalls einige Zellen diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche.

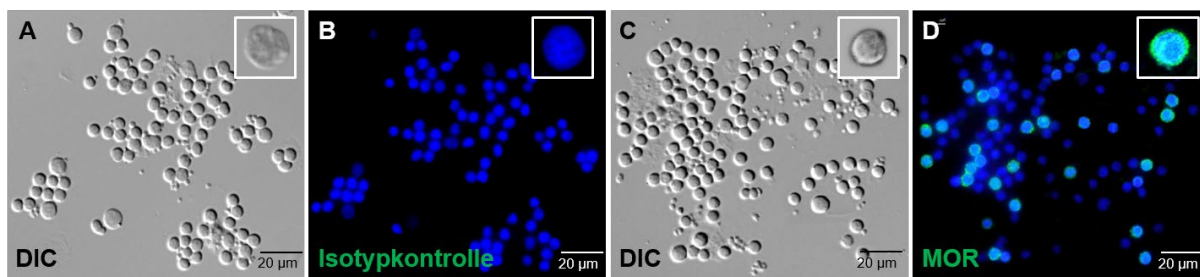


Abb. 4.16: Immunzytologischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors auf equinen PBMC

Die DIC-Aufnahme zeigt jeweils die PBMC der Isotypkontrolle (A) und die mit dem MOR-Antikörper gefärbten equinen PBMC (C). Die Zellen der Isotypkontrolle waren negativ (B). Eine Subpopulation der equinen PBMC zeigte eine Expression des μ -Opioidrezeptors (grün) (D). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Zusammenfassend konnten wir die Ausprägung des MOR auf einer Teilpopulation der PBMC aller untersuchten Spezies (Schwein, Rind und Pferd) nachweisen. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass BCM-7 über diesen Rezeptor an die Zellen bindet und ihre Funktionen beeinflusst.

4.6 Durchflusszytometrischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors

Um die Population der porcinen PBMC, die den MOR exprimiert, genauer zu phänotypisieren, untersuchten wir sie mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse. Wir führten eine Doppelfärbung mit dem Antikörper für den MOR und verschiedenen Subpopulationsmarkern für Lymphozyten (CD3 für T-Zellen und CD79 α für B-Zellen) durch. Dadurch konnten wir feststellen, dass sowohl die T- als auch B-Lymphozyten den MOR ausdrücken.

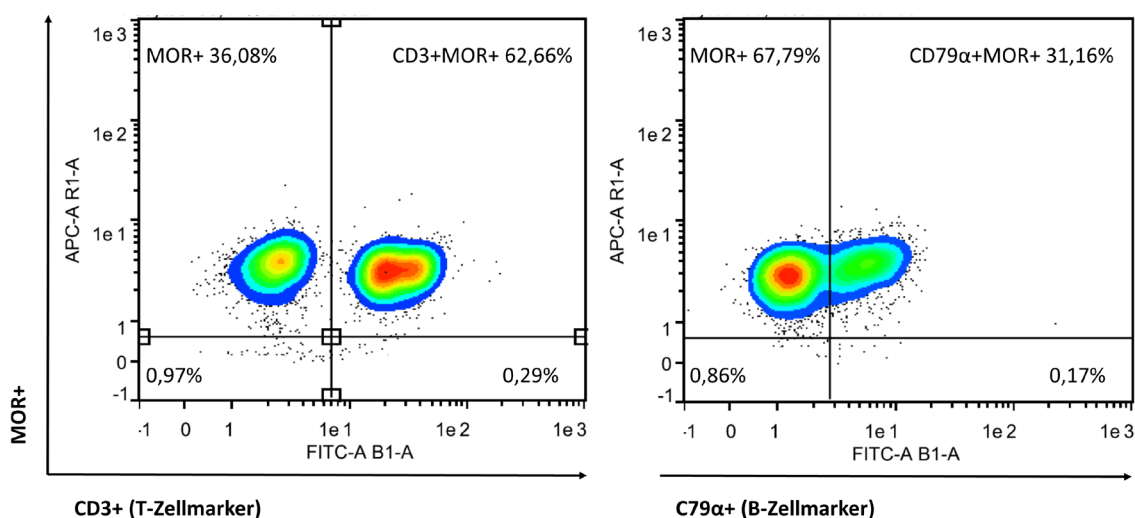


Abb. 4.17: Durchflusszytometrischer Nachweis des MOR auf porcinen T- und B-Lymphozyten

Exemplarisch sind porcine PBMC dargestellt, die doppelt positiv für den MOR und CD3 (linker Dotplot) sowie für MOR und CD79 α (rechter Dotplot). Sowohl T- (CD3+) als auch B-Lymphozyten (CD79 α +) prägen den MOR zu annähernd 100% aus (n=4).

4.7 Immunhistologischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors

Im weiteren Verlauf dieses Forschungsprojektes werden wir die Wirkung von BCM-7 auf immunologische und gastrointestinale Funktionen des Schweins genauer untersuchen. Deshalb interessierte uns, ob der MOR im Darm und in immunologischen Organen des Schweins vorhanden ist. Um dies zu untersuchen, färbten wir Paraffinschnitte aus Ileum und Lymphknoten des Schweins mit dem gleichen Antikörper gegen den MOR, der bereits bei der Immunzytologie eingesetzt wurde. Ein Schnitt durch den porcinen Hippocampus wurde als Positivkontrolle für den verwendeten Antikörper benutzt, da zumindest für Ratten und Mäuse bekannt

ist, dass der MOR in diesem Gewebe ausprägt wird (Blackwood et al. 2019; Shi et al. 2020).

4.7.1 Positivkontrolle am porcinen Hippocampus

Die Gliazellen im Hippocampus des Schweins wiesen den MOR in ihrem kompletten Soma auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass der verwendete primäre Antikörper geeignet ist an seine Zieldomäne am MOR des Schweins zu binden.

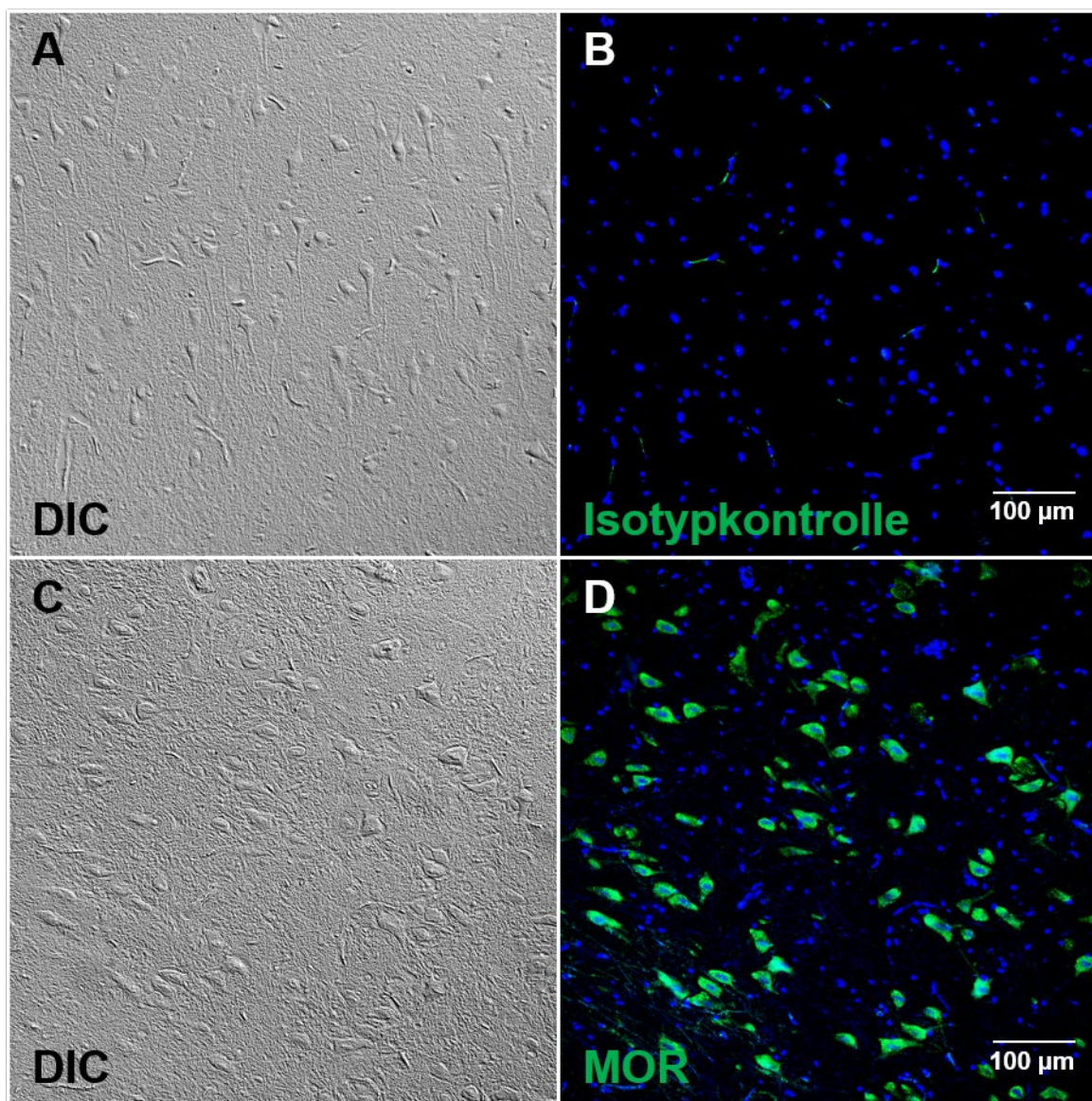


Abb. 4.18: Immunhistologischer Nachweis von μ -Opioidrezeptoren auf Zellen des porcinen Hippocampus

Auf der Abbildung sieht man die DIC-Aufnahme (A und C) von Gliazellen im porcinen Hippocampus. Die Isotypkontrolle war negativ (B). In Bildteil D sieht man deutlich, dass die Gliazellen den μ -Opioidrezeptor in ihrem Soma exprimieren (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.7.2 Nachweis des μ -Opioidrezeptors im Ileum des Schweins

Als nächstes führten wir den Nachweis des Rezeptors an porcinem Ileum durch, da BCM-7 als opioides Peptid auch Auswirkungen auf die Funktionen des Gastrointestinaltraktes hat und wir diese zukünftig genauer untersuchen wollen.

Wir konnten die Expression des MOR in einigen Zellen der ilealen Submukosa des Schweins nachweisen. Die positiven Zellen liegen hauptsächlich in der Kryptenregion

des Ileums. Die im Schnitt ebenfalls erkennbaren Lymphfollikel einer Peyer-Platte zeigten keinerlei Expression des MOR. Um die Zellen, die den MOR ausprägen, genauer zu charakterisieren, werden wir zukünftig weitere Färbungen mit verschiedenen Markern für die einzelnen Zelltypen vornehmen.

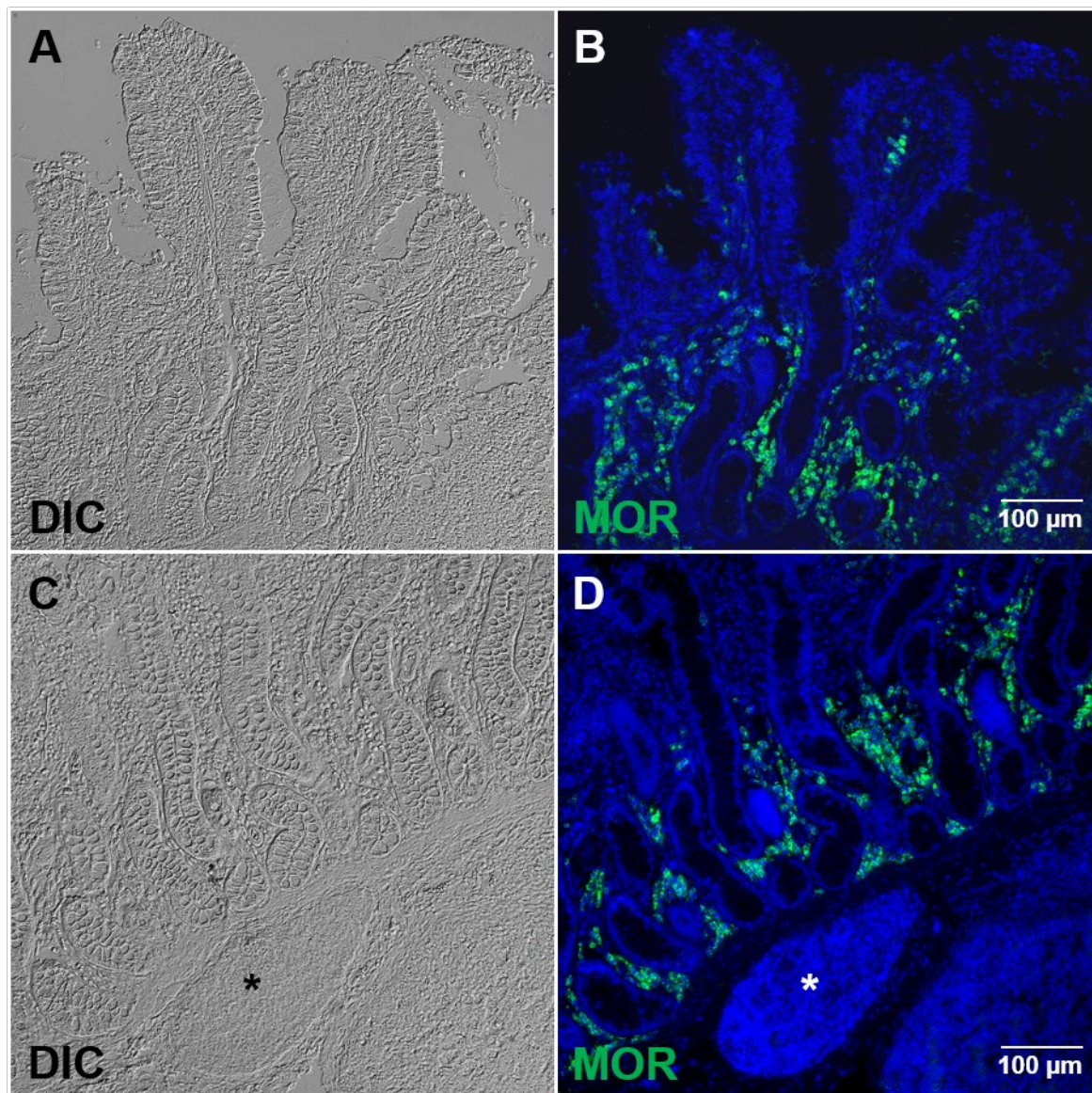


Abb. 4.19: Immunhistochemischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors in porcinem Ileum

Die DIC-Aufnahme (A und C) zeigt exemplarisch einen Querschnitt durch einen distalen Teil des porcinen Ileums. In den Bildteilen B und D sieht man vereinzelt Zellen, die den MOR ausprägen (grün). Diese Zellen liegen vermehrt in der Kryptenregion des Darmepithels. Der Lymphfollikel der Peyer-Platte im Bildteil D (mit * markiert) weist keinerlei Expression des MOR auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

4.7.3 Nachweis des μ -Opioidrezeptors im Lymphknoten des Schweins

Lymphknoten sind für die ordnungsgemäße Funktion des Immunsystems unerlässlich, da dort T- und B-Lymphozyten mit Antigenen in Kontakt kommen, daraufhin aktiviert werden und sich differenzieren (Itano et al. 2003; Moran et al. 2018). Uns interessierte, ob die Zellen im Lymphknoten des Schweins den MOR ausprägen und damit eine potentielle Bindungsstelle für BCM-7 und andere opioide Stoffe besitzen, die Einfluss auf die immunologische Funktion nehmen könnten.

Wir konnten mittels immunhistochemischer Färbung nachweisen, dass einige Zellen im parafollikulären Bereich des Leistenlymphknotens beim Schwein den MOR exprimieren. Im Bereich des Lymphfollikels konnte der Rezeptor nicht nachgewiesen werden.

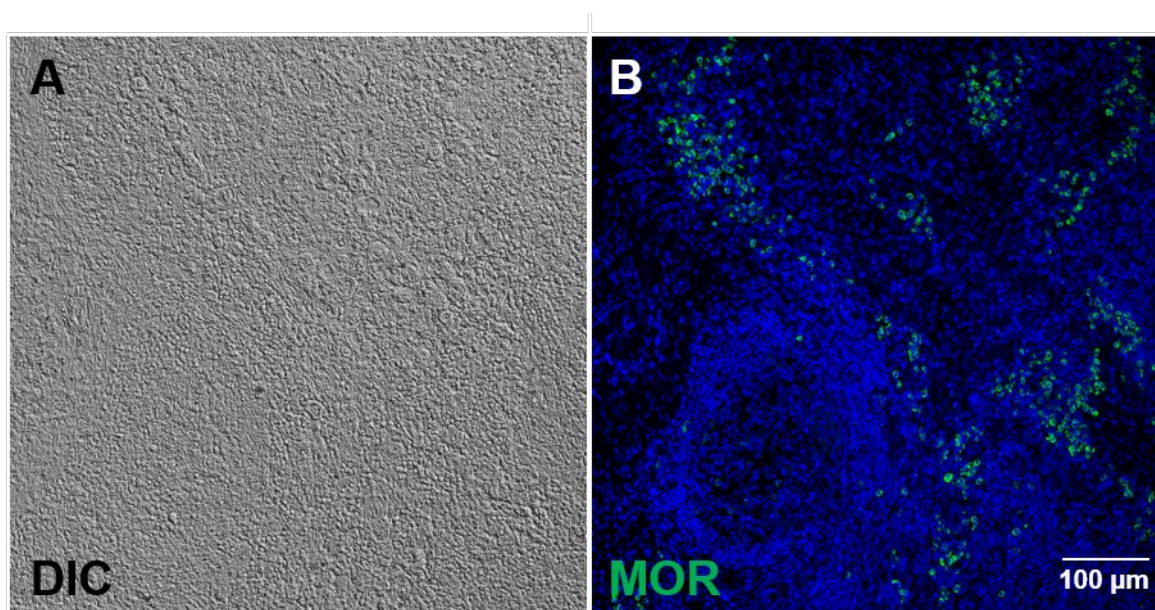


Abb. 4.20: Immunhistochemischer Nachweis des μ -Opioidrezeptors im porcinen Leistenlymphknoten

Die DIC-Aufnahme (A) zeigt einen Querschnitt durch einen Teilbereich des porcinen Leistenlymphknotens (Lnn. inguinalis). Im Bildteil B sieht man vereinzelt Zellen, die den MOR ausprägen (grün). Diese Zellen liegen im parafollikulären Bereich des Lymphknotens. Im linken unteren Bildbereich ist ein Lymphfollikel zu sehen. Hier befinden sich keine Zellen, die den MOR exprimieren.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von bovinem Beta-Casomorphin-7 (BCM-7) auf die Proliferation von porcinen PBMC untersucht. Das Schwein dient einerseits in vielen Bereichen der Medizin als gut geeignetes Tiermodell für den Menschen, da es viele Ähnlichkeiten in Physiologie, Anatomie sowie bei der immunologischen Funktion aufweist (Rothkötter 2009; Huang et al. 2014). Andererseits interessierte uns die Wirkung von BCM-7 auf das Schwein als Nutztier, da in der Schweinefütterung häufig Milchprodukte eingesetzt werden (Milchaustauscher, Magermilchpulver) und BCM-7 somit auch einen Einfluss auf die Immunfunktion der Tiere haben könnte. Wenn dies der Fall wäre, könnte dies große wirtschaftliche Bedeutung für die Schweineaufzucht und -mast haben, da insbesondere bei der Ferkelaufzucht die Krankheitsanfälligkeit eine bedeutende Rolle im Hinblick auf Wachstumseinbußen und Tierverluste spielt. Bislang wurden zur Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation von Immunzellen des Schweins, nach unserem Kenntnisstand, noch keine Studien durchgeführt (Stand der Pubmed-Literaturrecherche: 15.02.2021). Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, diesen Zusammenhang näher zu charakterisieren.

Da BCM-7 durch eine Punktmutation im Beta-Casein-Gen hauptsächlich bei der Verdauung aus den A1-Varianten der Milch entsteht (Asledottir et al. 2018), untersuchten wir zunächst die Wirkung von A1- und A2-Milch vergleichend auf die Proliferation der Zellen. Die Zugabe von roher Milch (0,5%) hemmte die Proliferation ConA-stimulierter porciner PBMC hochsignifikant (**** $p \leq 0,0001$), ein Unterschied zwischen A1- und A2-Milch war jedoch nicht erkennbar (siehe Kapitel 4.1.1). Da BCM-7 sowohl in unverdauter A1- als auch in A2-Milch in ähnlich niedrigen Konzentrationen auftritt (Nguyen et al. 2019), war zu erwarten, dass man ohne enzymatischen Verdau keinen Unterschied in der Wirkung feststellen kann. Die starke Hemmung der Proliferationsrate um 95 % durch Zugabe beider Milcharten, wurde demnach sehr wahrscheinlich durch andere Bestandteile der Milch verursacht. Bovines Laktoferrin hatte beispielsweise sowohl nach Verdau mit Pepsin, als auch unverdaut eine inhibitorische Wirkung auf ConA-stimulierte murine Splenozyten sowie Lymphozyten aus Peyer-Platten *in vitro* (Miyachi et al. 1997). Außerdem ist bekannt, dass Laktoferrin an T-Zellen des Menschen bindet und dadurch die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD4 verändert, das mit der Reifung der

Zellen assoziiert ist (Siqueiros-Cendón et al. 2014). Laktoferrin könnte also neben anderen Stoffen in der Milch zur Hemmung der Proliferation beigetragen haben. Eine bakterielle Kontamination als Ursache für die Hemmung wurde durch die Sterilfiltration und die starke Verdünnung der Milch vor Verwendung im Assay sowie durch mehrmalige mikroskopische Überprüfung der Kulturen auf Kontaminationen weitgehend ausgeschlossen. Nach *in vitro* Verdau bewirkte die Zugabe beider Milcharten weiterhin eine signifikante Hemmung der Proliferation (A1-Milch: ** $p \leq 0,01$; A2-Milch: * $p \leq 0,05$), die jedoch signifikant schwächer ausfiel als mit roher Milch (**** $p \leq 0,0001$). Man konnte jedoch auch nach der Verdauung keinen Unterschied zwischen der Wirkung von A1- und A2-Milch feststellen. Die Abschwächung der Hemmung nach der Verdauung könnte ihre Ursache darin haben, dass andere hemmende Stoffe in der Milch durch den Verdau unwirksam gemacht wurden. Dass wir keinen Unterschied zwischen A1- und A2-Milch in diesem Assay feststellen konnten, könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass die gewählte Verdaumethode nicht geeignet war um BCM-7 aus der Milch freizusetzen. Allerdings führten wir die *in vitro* Verdauung anhand des Protokolls durch, das vom internationalen Netzwerk für Verdauung von Lebensmitteln (INFOGEST) ausgearbeitet wurde. Dieses Protokoll wurde speziell entwickelt um die physiologischen Bedingungen bei der *in vitro* Verdauung möglichst realitätsnah zu simulieren (Minekus et al. 2014). In einer aktuellen Studie bestätigte sich außerdem die Anwendbarkeit des Protokolls auf die Verdauung des Schweins, indem die Peptidsequenzen von Milch nach Anwendung dieser *in vitro* Verdaumethode mit denen nach *in vivo* Verdauung bei Schweinen verglichen wurden (Egger et al. 2019). Wir konnten also weitgehend ausschließen, dass die Verdaumethode ungeeignet war, um BCM-7 aus der Milch freizusetzen. Es könnte aber sein, dass der Gehalt an BCM-7 generell zu niedrig war, um eine Wirkung auf die Proliferation der Zellen zu haben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Wirkung von BCM-7 von anderen stärker hemmend wirkenden Stoffen in der Milch überdeckt wurde oder dass BCM-7 schlichtweg keine Wirkung auf die Proliferation der porcinen PBMC hatte. Es gibt zwei Publikationen, die eine ähnliche Fragestellung bearbeitet haben, wie sie diesem Versuch zugrunde lag. Eine Arbeitsgruppe untersuchte die Wirkung von *in vitro* verdauten Caseinkomponenten auf die Proliferation polyklonal stimulierter muriner Splenozyten sowie auf Lymphozyten aus den Peyer Platten des Kaninchens (Otani et al. 1995). Sie fanden heraus, dass sowohl mit Trypsin als auch mit Pankreatin

verdautes Beta-Casein eine signifikant hemmende Wirkung auf die Proliferation beider Zellarten hatte, intaktes Beta-Casein hingegen zeigte keinen Effekt (Otani et al. 1995). In einer anderen Studie beobachteten Wissenschaftler bei PHA-stimulierten PBMC des Menschen ebenfalls eine signifikant niedrigere Proliferationsrate durch Zugabe von verdauter Milch bzw. Beta-Casein (Sütas et al. 1996). Die Hemmung wurde nach Verdau mit Pepsin und Trypsin beobachtet und wurde nach zusätzlicher Zugabe von Enzymen aus dem Bakterium *Lactobacillus casei* noch stärker (Sütas et al. 1996). Der genaue Beta-Casein-Typ (A1 oder A2) wurde in diesen beiden Studien jedoch nicht bestimmt. Dies war ein wichtiger Unterschied zu unserem Versuch, in dem wir die hemmende Wirkung von A1- und A2-Milch, sowohl unverdaut als auch verdaut, bestätigen konnten. Bei allen bisher beschriebenen Versuchen inklusive dem unsrigen, könnten aber durchaus auch andere biologisch aktive Peptide als BCM-7 aus der Milch für die Hemmung verantwortlich sein, da die entstandenen Peptide bzw. deren genauer Wirkungsmechanismus nicht näher charakterisiert wurden. Aus diesem Grund versuchten wir BCM-7 mittels ELISA in der künstlich verdauten Milch nachzuweisen und vergleichend zum Gehalt in der rohen Milch zu quantifizieren. Bislang kamen wir hierbei allerdings zu keinem reproduzierbaren Ergebnis. Dies könnte an methodischen Problemen im Assay gelegen haben, z.B. hatten wir in mehreren Versuchen einen sehr hohen Hintergrundwert, der auf eine ungenügende Blockade der Platte oder auf unspezifische Bindungen des verwendeten Antikörpers hinweisen kann. Wir werden weiter an der Etablierung des ELISA-Tests in diesem Zusammenhang arbeiten, um in zukünftigen Versuchen die genaue Quantifizierung von BCM-7 in der künstlich verdauten Milch vornehmen zu können.

Aus bereits publizierten Studien geht hervor, dass der definierende Unterschied zwischen A1- und A2-Milch in der Aminosäure an Position 67 im Beta-Casein liegt und dadurch die Menge an BCM-7 bestimmt wird, die bei der Verdauung aus dem jeweiligen Protein entsteht (Jinsmaa et al. 1999; Asledottir et al. 2018). Da wir zwischen der Wirkung von verdauter A1- und A2-Milch keinen Unterschied in der Proliferation von porcinen PBMC feststellen konnten, wendeten wir im nächsten Schritt kommerziell erworbenes, reines BCM-7 in verschiedenen Konzentrationen im Proliferationsassay an. Zur Proliferation von Immunzellen des Schweins wurden mit BCM-7 bislang noch keine Studien durchgeführt (Stand der Pubmed-Literaturrecherche: 15.02.2021). Wir konnten somit erstmals zeigen, dass BCM-7 in

Konzentrationen von 0,01 bis 100 µg/ml eine signifikant hemmende Wirkung auf die Proliferation porciner PBMC hat (siehe Kapitel 4.1.2). Niedriger konzentriert hatte BCM-7 keinen signifikanten Effekt auf die Zellen. Des Weiteren fanden wir heraus, dass Naloxon (Opioidantagonist), anstatt wie erwartet die Hemmung durch BCM-7 aufzuheben, die Proliferation der Zellen selbst signifikant stärker hemmt als BCM-7 alleine (siehe Kapitel 4.1.3). Naloxon wirkte demnach synergistisch zu BCM-7 und nicht, wie wir erwartet hatten, antagonistisch. Mit porcinen Zellen wurden bislang keine vergleichbaren Versuche vorgenommen, weswegen wir unsere Ergebnisse mit Untersuchungen an Immunzellen des Menschen verglichen. Die publizierten Ergebnisse zur Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation von Immunzellen des Menschen waren allerdings unterschiedlich (Elitsur et al. 1991; Kayser et al. 1996; Fiedorowicz et al. 2011). Die Proliferation von ConA-stimulierten Lamina propria Lymphozyten aus Kolon und Ileum des Menschen wurde beispielsweise durch BCM-7 in Konzentrationen zwischen 10 und 250 µg/ml signifikant gehemmt (Elitsur et al. 1991). Die Hemmung war mit dem kompetitiven Opioidantagonisten Naloxon aufhebbar, was laut der Autoren zeigte, dass die beobachtete hemmende Wirkung von BCM-7 direkt über Opioidrezeptoren auf diesen Zellen vermittelt wird (Elitsur et al. 1991). Die von uns beobachtete Hemmung auf die Proliferation porciner PBMC war nicht durch Naloxon antagonisierbar, weshalb wir annehmen, dass die Wirkung von BCM-7 an den porcinen Zellen nicht durch Bindung an Opioidrezeptoren verursacht wird. Naloxon verursacht selbst eine signifikant hemmende Wirkung auf die porcinen Zellen, weswegen sich kein Antagonismus zu BCM-7 an besagten Rezeptoren zeigen konnte. Auch mit ConA stimulierte humane PBMC zeigten bei Behandlung mit niedrigen Konzentrationen an BCM-7 (10^{-12} bis 10^{-7} M) eine gehemmte, mit höheren Konzentrationen ab 10^{-6} M dagegen eine gesteigerte Proliferation (Kayser et al. 1996). BCM-7 hat ein Molekulargewicht von 789,93 g/mol, so entsprechen 10^{-6} M ca. 0,78 µg/ml. Demnach zeigten die PBMC des Menschen hier im Gegensatz zu denen des Schweins in unserem Versuch eine gesteigerte Proliferationsrate nach Zugabe vergleichbarer Konzentrationen an BCM-7 (Kayser et al. 1996). Eine andere Arbeitsgruppe stellte durch die Zugabe von BCM-7 ebenfalls eine Steigerung der Proliferation mit PHA stimulierter humaner PBMC fest (Fiedorowicz et al. 2011). Signifikant war die Steigerung allerdings nur durch BCM-7 in einer Konzentration von 10^{-12} M (Fiedorowicz et al. 2011). In dieser niedrigen Konzentration hatte BCM-7 auf die porcinen PBMC in unseren Versuchen keinen

signifikanten Effekt mehr. Naloxon hatte jedoch auch auf die PBMC des Menschen eine signifikant hemmende Wirkung (Fiedorowicz et al. 2011). Die unterschiedliche Wirkung von BCM-7 auf die humanen und die porcinen PBMC könnte speziesbedingt sein oder durch methodische Ursachen wie z.B. die unterschiedlich lange Stimulationsdauer oder die Verwendung verschiedener Mitogene (ConA und PHA) hervorgerufen worden sein. Zusätzlich trennten Kayser und Meisel nach 24 Stunden die Lymphozyten von den Monozyten (Kayser et al. 1996). Dies könnte zu einer veränderten Proliferationsrate geführt haben, da Monozyten Vorstufen von endogenen Opioiden wie Met-Enkephalin sezernieren und damit Einfluss auf die Proliferation von Lymphozyten nehmen können (Kamphuis et al. 1998). Auch Beta-Endorphin wird von Monozyten produziert (Azma et al. 2018) und veränderte *in vitro* die Proliferation von PHA-stimulierten humanen Lymphozyten abhängig vom Alter der Probanden (Gein et al. 2012). Das Entfernen der Monozyten im Versuch von Kayser und Meisel könnte also die Proliferation der PBMC beeinflusst haben. Der Unterschied zu den Ergebnissen von Fiedorowicz et al. könnte darin begründet sein, dass sie PHA zur Stimulation verwendeten, anstatt ConA. Um dies zu überprüfen führten wir mit den porcinen Zellen ebenfalls Proliferationsassays mit BCM-7 und Naloxon unter Verwendung von weiteren Lektinen (PHA, BanLec, PWM) durch. Es stellte sich heraus, dass mit diesen Lektinen weder BCM-7 noch Naloxon die Proliferation porciner PBMC signifikant veränderten (siehe Kapitel 4.1.4). Dieses Ergebnis war sehr interessant. Es zeigte dass die Reaktion von porcinen PBMC auf BCM-7 und Naloxon nur in Verbindung mit ConA auftritt. Trotz der weit verbreiteten Nutzung von Pflanzenlektinen zur Anregung der T- und B-Zellproliferation durch immunstimulierende Eigenschaften (Carvalho et al. 2018) sind die genauen zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwege weder bei der Maus noch beim Menschen hinreichend bekannt (Pubmed-Literaturrecherche am 23.02.2021). Es ist bereits beschrieben, dass ConA die Proliferation von porcinen PBMC ebenfalls stimuliert, aber der genaue Mechanismus ist auch hier noch unklar (Novak et al. 2018; Vatzia et al. 2019). Im Hinblick auf unser Ergebnis wäre es interessant den Funktionsmechanismus von ConA im Vergleich zu den anderen Lektinen zu untersuchen, um herauszufinden, weshalb die Zellen in Verbindung mit ConA anders auf BCM-7 und Naloxon reagieren.

Nachdem wir gezeigt haben, dass BCM-7 eine signifikant hemmende Wirkung auf die Proliferation porciner PBMC hat, stellten wir uns die Frage, wie diese Hemmung

zustande kommt. Eine Möglichkeit wäre, dass BCM-7 die Sekretion bestimmter Zytokine beeinflusst, die proliferationsanregend wirken, wie z.B. Interleukin-2 oder -4 (IL-2, IL-4). Es wurde bereits gezeigt, dass bovines BCM-7 und Morphin die Sekretion von IL-8 durch humane PBMC signifikant steigern (Fiedorowicz et al. 2011). Die Sekretion von IL-4 wurde nur durch Morphin signifikant gesteigert, nicht aber durch BCM-7 (Fiedorowicz et al. 2011). Eine genauere Untersuchung an primären T-Zellen und der Jurkat-T-Zelllinie des Menschen zeigte, dass Opioide wie Morphin in der Lage sind Transkriptionsfaktoren wie NFAT und NF- κ B zu modulieren, die die Genexpression von Interleukinen regulieren (Börner et al. 2013). Allerdings bewirkte eine Inkubation der T-Zellen mit Morphin für drei und fünf Stunden eine Hemmung von NF- κ B durch die verstärkte Bildung einer ubiquitinierenden Protease, die dafür sorgt, dass der Transkriptionsfaktor seine Wirkung nicht entfalten kann (Börner et al. 2013). Demnach müsste die Sekretion von Interleukinen wie IL-8 nach Opioidzugabe verringert sein, wenn diese die Funktion von NF- κ B hemmen. Dies widerspricht dem Ergebnis von Fiedorowicz et al., die eine Steigerung der IL-8-Sekretion nach Zugabe von Morphin und BCM-7 nachgewiesen haben (Fiedorowicz et al. 2011). Allerdings wurden die Zellen in dieser Studie auch 12 Stunden lang mit BCM-7 und Morphin inkubiert, was einen Unterschied in der Wirkung der Opioide erklären könnte. Zu unserem Ergebnis, dass BCM-7 die Proliferation der porcinen PBMC hemmt, würde der Mechanismus, den Börner et al. beschrieben haben, passen weil die Hemmung von NF- κ B zur verminderten Expression einiger proliferationsanregender Interleukine führt und die Proliferation somit gehemmt wird. Es könnte jedoch auch ein völlig anderer Mechanismus der Hemmung durch BCM-7 zugrunde liegen der bei den Immunzellen des Schweins noch genauerer Untersuchung bedarf.

Interessant war in einer der Publikationen mit PBMC des Menschen auch der Vergleich der Wirkung von bovinem mit humanem BCM-7, welches mit 10^{-12} M ebenso wie bovines BCM-7 eine signifikante Steigerung der Proliferation bewirkte (Fiedorowicz et al. 2011). Wenn BCM-7 aus Muttermilch eine vergleichbare Wirkung auf Immunzellen ausübt, wie bovines BCM-7, könnte die Diskussion um die Auswirkungen von BCM-7 aus Kuhmilch auf Säuglinge, z.B. im Zusammenhang mit plötzlichem Kindstod, entschärft werden. Allerdings müssten genauere Untersuchungen erfolgen, ob und in welchen Konzentrationen BCM-7 tatsächlich aus Muttermilch entsteht und ob dessen Wirkung vergleichbar mit der von BCM-7 aus

Kuhmilch ist. Bisher sind nur längere Beta-Casomorphine (BCM-8, -9, -10 und -11) in Muttermilch nachgewiesen worden, BCM-7 jedoch nicht (Enjapoori et al. 2019). Es wäre interessant in zukünftigen Versuchen humanes BCM-7 im Vergleich zu bovinem auf den PBMC des Schweins zu testen, um etwaige Unterschiede in deren Wirkprofil feststellen zu können.

Um zu untersuchen, ob die Wirkungen von BCM-7 und Naloxon auf die porcinen PBMC speziesspezifisch ist, testeten wir die Substanzen als nächstes im Proliferationsassay mit bovinen PBMC. Unseres Wissens gibt es noch keine publizierten Studien zur Proliferation von bovinen Immunzellen unter dem Einfluss von BCM-7 (Stand der Pubmed-Literaturrecherche: 01.03.2021). Unser Ergebnis stellt demnach einen weiteren wichtigen Beitrag zur Erforschung der Wirkung von BCM-7 auf die Immunzellen verschiedener Spezies dar. Es zeigte sich, dass BCM-7 (1 µg/ml) auf die Proliferation der Rinderzellen eine signifikant steigernde Wirkung ausübte (siehe Kapitel 4.3). Die porcinen Zellen zeigten dagegen mit BCM-7 in dieser Konzentration eine signifikant gehemmte Proliferationsrate (siehe Kapitel 4.1.3). Demnach wirkt BCM-7 gegensätzlich auf die PBMC der beiden Spezies. Naloxon bewirkte dagegen interessanterweise eine signifikante Hemmung der Proliferation beider Spezies (siehe Kapitel 4.1.3 und 4.3). Fiedorowicz et al. stellten ebenfalls eine signifikant hemmende Wirkung von Naloxon auf die Proliferation von PHA-stimulierten PBMC des Menschen fest (Fiedorowicz et al. 2011). Nach Stimulation mit PHA konnten wir bei den porcinen PBMC keine signifikante Veränderung der Proliferation durch Naloxon feststellen, mit ConA jedoch zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation. Damit reagierten die porcinen und bovinen Zellen zumindest im Hinblick auf Naloxon ähnlich wie die humanen Zellen in den Versuchen dieser Arbeitsgruppe.

Im weiteren Verlauf unserer Versuche verglichen wir die Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation der porcinen PBMC mit vier verschiedenen selektiven Opioidliganden. Zwei der selektiven Liganden, Morphin und DAMGO, wirken wie BCM-7 ebenfalls μ -selektiv, Deltorphin II hingegen wirkt an δ - und U69,593 an κ -Rezeptoren. Wir konnten mit keinem der Opioidliganden einen signifikanten Effekt auf die porcinen PBMC feststellen (siehe Kapitel 4.2.1). Mit Morphin wurde bislang fast ausschließlich eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Immunzellen bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen beschrieben (Bryant et al. 1988; Sergeeva et al. 1993; Fiedorowicz et al. 2011). Die subkutane Verabreichung von Morphin-Pellets an

Mäuse löste beispielsweise nach 48-72 Stunden eine signifikante Hemmung der Proliferation der Splenozyten und Thymozyten aus (Bryant et al. 1988). Die ConA-stimulierten PBMC der Ratte proliferierten nach zentraler Verabreichung von Morphin ebenfalls signifikant weniger (Houghtling et al. 2000) und auch bei PHA-stimulierten PBMC des Menschen wurde eine signifikante Hemmung der Proliferation durch die *in vitro* Zugabe von Morphin festgestellt (Govitrapong et al. 1998; Fiedorowicz et al. 2011). Die fehlende Reaktion der PBMC des Schweins auf Morphin, könnte verschiedene Ursachen haben. Bislang wurde an PBMC des Schweins nur gezeigt, dass nach Morphin-Behandlung (0,5 mg/kg Körpergewicht) *in vivo* dosisabhängig eine signifikant verstärkte Aktivität der Killerzellen festzustellen war, mit 5 mg/kg war die Aktivität hingegen vermindert (Borman et al. 2009). Morphin hat demnach einen Einfluss auf die Funktionen von PBMC, aber die Wirkung auf die Proliferation dieser Zellen wurde beim Schwein noch nicht untersucht. Das Immunsystem des Schweins funktioniert grundsätzlich ähnlich wie das des Menschen (Dawson et al. 2013), weshalb die ausbleibende Reaktion der porcinen PBMC auf Morphin überraschend war. Die wichtigsten methodischen Unterschiede zwischen unserem Versuch und den Studien mit humanen PBMC waren die Verwendung verschiedener Mitogene und eine unterschiedlich lange Stimulationsdauer. Wir stimulierten die PBMC mit ConA über 48 Stunden und ließen Morphin die komplette Stimulationszeit über auf die Zellen einwirken. Die humanen PBMC wurden in beiden Studien 60-66 Stunden mit PHA stimuliert. Fiedorowicz et al. gaben das Morphin erst nach 48 Stunden PHA-Stimulation dazu, Govitrapong et al. ließen das Morphin ebenso wie wir den ganzen Stimulationszeitraum über einwirken. Diese methodischen Unterschiede könnten dazu geführt haben, dass unsere porcinen PBMC nicht auf Morphin reagierten. Es könnten aber auch durchaus speziesspezifische Unterschiede zwischen Mensch und Schwein dafür verantwortlich sein. Zusätzlich zur Wirkung von Morphin untersuchten wir drei weitere selektive Opioidliganden im Proliferationsassay mit porcinen PBMC. DAMGO ist ein μ -selektives synthetisches Analogon des endogenen Opioids Enkephalin (Koehl et al. 2018). Zu seiner Wirkung auf die Proliferation von Immunzellen wurden bislang nur wenige Studien durchgeführt, für die ausschließlich Ratten und Mäuse verwendet wurden (Kowalski 1998; Nelson et al. 2000). Sowohl nach intraperitonealer Verabreichung an Mäuse als auch bei *in vitro* Anwendung in Konzentrationen von 10^{-12} bis 10^{-6} M für 72 Std, bewirkte DAMGO eine signifikante Steigerung der Proliferation mit ConA und Lipopolysaccharid (LPS) stimulierter

Splenozyten, die mit dem μ -Rezeptorantagonisten β -Funaltrexamin aufhebbar war (Kowalski 1998). Dagegen bewirkte DAMGO eine Stunde nach intrazerebroventrikulärer Verabreichung an Ratten eine signifikante, Naloxon-reversible, Hemmung der Proliferation ConA-stimulierter Splenozyten (Nelson et al. 2000). Vergleicht man diese beiden Versuche, hat DAMGO eine gegensätzliche Wirkung auf die Splenozyten der beiden Tierarten. Da Ratten und Mäuse sich in ihrer Physiologie recht ähnlich sind, liegt die Ursache hierfür vermutlich eher in der unterschiedlichen Verabreichungsform bzw. in der gewählten Dosierung des Opioidliganden. Die porcinen PBMC in unserem Versuch zeigten wiederum gar keine Reaktion auf die *in vitro* Zugabe von DAMGO (siehe Kapitel 4.2.1). Die von uns angewendete Konzentration von 10^{-6} M entspricht der von Kowalski verwendeten Konzentration, mit der eine Steigerung der Proliferation von murinen Splenozyten beobachtet werden konnte (Kowalski 1998). Allerdings kultivierten wir die Zellen nur für 48 statt 72 Stunden, was durchaus einen Unterschied verursacht haben könnte. Vergleichend mit den μ -selektiven Liganden untersuchten wir ebenfalls die Wirkung von U69,593 (κ -selektiv) und Deltorhin II (δ -selektiv) im Proliferationsassay. Nach Zugabe von U69,593 konnten wir keine Veränderung im Proliferationsverhalten mit ConA stimulierter porciner PBMC feststellen (siehe Kapitel 4.2.1). Unser Ergebnis passt demnach zu dem von Nelson et al, da sie ebenfalls keinen Effekt nach zerebroventrikulärer Verabreichung von U69,593 an Ratten beobachten konnten (Nelson et al. 2000). Die Proliferation ConA-stimulierter Splenozyten der behandelten Ratten blieb unverändert, weshalb die Autoren annahmen, dass der KOR keine wichtige Rolle in der Opioid-induzierten Immunmodulation spielt (Nelson et al. 2000). Diese Hypothese konnten wir nun auch am Schwein bestätigen. Deltorhin II wurde hingegen, nach unserem Kenntnisstand, noch nicht in Proliferationsassays mit Immunzellen getestet (Stand der Pubmed-Literaturrecherche 01.03.2021). Auf die Proliferation der porcinen PBMC hatte dieser δ -selektive Ligand ebenso wie U69,593 keinerlei Auswirkungen (siehe Kapitel 4.2.1). Das strukturell und funktional ähnliche Deltorhin I hemmte die Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen der Maus, die mit anti-CD3- ϵ stimuliert wurden, signifikant (Shahabi et al. 1995). Dieser Versuch mit Deltorhin I ist kaum mit unseren Untersuchungen vergleichbar, da Zellen einer anderen Tierart und mit anti-CD3- ϵ auch eine völlig andere Art der Stimulation verwendet wurden. Der Anti-CD3- ϵ -Antikörper vernetzt CD3-Heterodimere der T-Zell-Rezeptoren und imitiert so die physiologische Bindung an Antigene auf Antigen-

präsentierenden Zellen (Shahabi et al. 1995; Calise et al. 2018). Auf die Proliferation mit PHA stimulierter humaner PBMC hatte Deltorhin I eine dosisabhängige signifikant steigernde Wirkung (Noviello et al. 1997). Eine solche Steigerung konnten wir allerdings mit Deltorhin II bei den porcinen PBMC nicht hervorrufen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zu BCM-7 keiner der selektiven Opioidliganden eine signifikante Veränderung der Proliferation porciner PBMC bewirkte.

Deswegen konzentrierte sich der zweite Teil dieser Arbeit auf den Nachweis von Opioidrezeptoren auf porcinen Zellen, um herauszufinden, ob das daran liegt, dass sie die erforderlichen Rezeptoren nicht exprimieren. Die Ausprägung von Opioidrezeptor-Subtypen auf porcinen Zellen wurde bisher nur sporadisch untersucht. Lediglich die Arbeitsgruppe, die die porcinen Opioidrezeptoren als erste erfolgreich klonierte, zeigte, dass porcine PBMC die mRNA für den DOR und den KOR besitzen, die für den MOR jedoch nicht (Pampusch et al. 1998). Da wir jedoch eine Wirkung durch BCM-7 feststellen konnten, welches vorwiegend μ -selektiv wirkt, entschieden wir, dass der erneute Rezeptornachweis auf diesen Zellen ein sinnvoller Schritt ist. Zunächst untersuchten wir die porcinen PBMC mittels PCR auf die spezifische mRNA für die verschiedenen Rezeptortypen. Unsere Untersuchung zeigte interessanterweise, dass die Zellen nur die mRNA für den DOR enthalten. Die spezifische Bande war jedoch recht schwach ausgeprägt. Die Sequenz für den MOR und den KOR war dagegen nicht nachweisbar. Außerdem fanden wir heraus, dass die 48-stündige Stimulation mit ConA die Expression der spezifischen mRNA verhinderte, da auch die mRNA für den DOR in stimulierten Zellen nicht mehr nachweisbar war (siehe Kapitel 4.4.1). Das gleiche Ergebnis erhielten wir auch bei der Untersuchung von Lymphozyten aus den Peyer Platten des Ileums beim Schwein (siehe Kapitel 4.4.3). Diese Erkenntnisse unterschieden sich von denen von Pampusch et al., da wir nur den DOR nachweisen konnten, den KOR jedoch nicht. Des Weiteren war es überraschend, dass die mRNA für den MOR nicht nachweisbar war, da BCM-7 in unseren vorherigen Versuchen eine deutliche Wirkung auf die Proliferation der Zellen zeigten und wir demnach erwarteten, dass die Zellen den MOR exprimieren. Da die anderen Opioide, die selektiv für den KOR und den DOR sind, keine Wirkung im Proliferationsassay zeigten, vermuteten wir diese Rezeptortypen hingegen nicht auf den Zellen. Neben der direkten Wirkung über Opioidrezeptoren sind jedoch auch andere Mechanismen beschrieben, über die

Opioide auf Immunzellen einwirken können. Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Morphin neben den klassischen Opioidrezeptoren auch an den Toll-like-Rezeptor (TLR), speziell den TLR-4, binden und so eine Wirkung auf immunologische Funktionen ausüben kann (Maher et al. 2020). So zeigten natürliche Killerzellen des Menschen unter Einfluss von Morphin eine verringerte Fähigkeit zur Induktion der Apoptose von Tumorzellen und dieser Effekt konnte sowohl mit Naloxon als auch mit TAK-242 (selektiver Inhibitor am TLR-4) inhibiert werden (Maher et al. 2020). Auch die hemmende Wirkung von Morphin auf die Peristaltik des Kolons von Mäusen *in vivo* wurde durch den TAK-242-Inhibitor abgeschwächt, was eine Beteiligung des TLR-4 an diesem Effekt bewies (Farzi et al. 2015). Porcine PBMC exprimieren die mRNA für den TLR-4 (Uddin et al. 2012). Außerdem zeigten funktionelle Untersuchungen, dass der TLR-4-Agonist Inulin-Acetat die Produktion proliferativer Zytokine durch porcine PBMC aktivierte (Kumar et al. 2016). Eine Präinkubation der Zellen mit einem TLR-4-spezifischen Antagonisten verhinderte die Aktivierung der Zytokinproduktion (Kumar et al. 2016). Die Wirkung von BCM-7 auf die porcinen PBMC könnte demnach ebenfalls über den TLR-4, anstatt über den MOR vermittelt werden. Des Weiteren können manche Opioide auch rezeptor-unvermittelt Einfluss auf Zellen nehmen (Maximyk et al. 2015). Das endogene Opioid Dynorphin reicherte sich beispielsweise in der Plasmamembran einer murinen Zelllinie (PC12) an und verursachte eine erhöhte Permeabilität durch Porenbildung (Maximyk et al. 2015). Es ist also potentiell möglich, dass BCM-7 über andere Mechanismen als über μ -Opioidrezeptoren auf die porcinen PBMC einwirkt. Wir evaluierten dennoch die möglichen Fehlerquellen, die dazu geführt haben könnten, dass wir die mRNA für den MOR in den PBMC nicht nachweisen konnten. Die verwendeten Primer waren geeignet, um die jeweiligen Sequenzen der Rezeptoren zu detektieren. Dies zeigte die durchgeführte Positivkontrolle mit einer kommerziell erworbenen cDNA aus porcinem Hypothalamus, die alle drei Subtypen enthält. Außerdem wurde die Integrität der untersuchten cDNA-Proben durch den Nachweis der mRNA für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) überprüft. Die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA war demnach erfolgreich. Es könnte jedoch sein, dass die Mengen an spezifischer mRNA für den MOR und den KOR in den Zellen zu gering waren um sie mit dieser Methode nachzuweisen. Aus diesem Grund entschieden wir uns, zur Bestätigung eine immunzytologische Untersuchung als zweite Nachweismethode anzuwenden. Dazu färbten wir porcine PBMC zunächst

mit einem primären Antikörper gegen den intrazellulären C-Terminus des MOR und nachfolgend mit einem zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet war. Die Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop zeigte deutlich, dass einige Zellen der PBMC-Population den MOR ausprägen, wenn auch nicht alle (siehe Kapitel 4.5.1). Dieser immunzytologische Nachweis des MOR ist, unseres Wissens, der erste auf porcinen PBMC. Zur genaueren Charakterisierung der Zellen, die den MOR ausprägen führten wir eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen durch. Die Doppelfärbung mit dem MOR-Antikörper und den beiden Subpopulationsmarkern für Lymphozyten (CD3 für T-Zellen und CD79 α für B-Zellen) brachte das Ergebnis, dass sowohl die T- als auch die B-Zellen des Schweins den MOR exprimieren (siehe Kapitel 4.6). Zum Vergleich zwischen den verschiedenen Tierarten untersuchten wir bovine und equine PBMC ebenfalls und konnten die Expression des MOR auch auf diesen Zellen nachweisen (siehe Kapitel 4.5.2 und 4.5.3). Zum Nachweis von Opioidrezeptoren auf PBMC beim Menschen gibt es bereits einige publizierte Studien, die Ergebnisse differieren jedoch. Manche Arbeitsgruppen konnten in den PBMC nur die mRNA für den KOR und den DOR finden (Gaveriaux et al. 1995; Wick et al. 1996), was sich mit den Ergebnissen von Pampusch et al. beim Schwein deckt (Pampusch et al. 1998). In einer Publikation wurde gezeigt, dass primäre T-Zellen sowie die humane T-Zelllinie Jurkat den MOR erst durch Induktion mit IL-4 und TNF- α ausprägten (Börner et al. 2007). Eine Studie mit ehemaligen heroinabhängigen Probanden zeigte, dass deren periphere Blutlymphozyten unter Methadon-Therapie signifikant weniger mRNA für den DOR und den MOR enthielten, als die Zellen gesunder Menschen (Toskulkao et al. 2010). Andere Wissenschaftler fanden wiederum gar keinen der drei Subtypen, aber stattdessen den Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptor (NOR) auf humanen PBMC (Williams et al. 2007; Al-Hashimi et al. 2016). In diesen beiden Publikationen wurde der Nachweis, im Gegensatz zu den anderen, nicht nur durch eine PCR, sondern auch mittels Radioliganden-Bindungsassay und Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkiertem Naloxon geführt und dennoch konnte keiner der klassischen Opioidrezeptoren nachgewiesen werden (Williams et al. 2007; Al-Hashimi et al. 2016). Eine aktuellere Studie brachte wiederum das Ergebnis, dass der MOR in verschiedenen T-Zellsubpopulationen (CD4+, CD8+), Monozyten und in natürlichen Killerzellen exprimiert wird, in B-Zellen jedoch nicht (Karagiannis et al. 2020). Die beiden anderen klassischen Rezeptortypen DOR und KOR waren in den untersuchten Zellen schwach

ausgeprägt oder nicht detektierbar, wohingegen der NOR in allen Zellen vorhanden war (Karagiannis et al. 2020). Aufgrund dieser Diskrepanz in den publizierten Ergebnissen entschieden wir uns die PBMC des Menschen ebenfalls erneut auf die Ausprägung von Opioidrezeptoren zu untersuchen. Wir fanden eine deutliche Expression der mRNA für den DOR und den MOR, die mRNA für den KOR war nicht nachweisbar (siehe Kapitel 4.4.2). Allerdings war dieses Ergebnis nicht ganz eindeutig, da die erwarteten Bandenlängen für den MOR (246 bp) und den DOR (331 bp) sich deutlicher unterscheiden sollten. Auch der Längenmarker zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen 200 und 300 bp, aber die erhaltenen Banden waren ähnlich lang. Demnach ist nicht ganz klar, ob es sich hierbei um die spezifischen Banden für den MOR und den DOR handelt. Es stellte sich weiterhin die Frage, weshalb die Ergebnisse des Nachweises in den Publikationen derart unterschiedlich ausfallen. Einerseits ist es möglich, dass die Menge an spezifischer mRNA für die Opioidrezeptoren in manchen Fällen nicht ausreichte, um sie mittels PCR zu detektieren. Auch in Radioliganden-Bindungsassays könnte eine geringe Dichte oder das beschränkte Auftreten der Rezeptoren in nur einer bestimmten Subpopulation der Lymphozyten zu einem falsch negativen Ergebnis geführt haben. Weitere methodische Probleme, die das Ergebnis der PCR verfälschen könnten, wie defekte oder unpassende Primer oder Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA sind ebenfalls denkbar. Andererseits gibt es aber auch einige Publikationen, die beschreiben, dass bestimmte pathologische Zustände die Ausprägung von Opioidrezeptoren auf Immunzellen verändern können. Die PBMC chronischer Schmerzpatienten (rheumatoide Arthritis) wiesen beispielsweise eine signifikant niedrigere mRNA-Expression für den KOR auf als die Zellen gesunder Menschen (Gunji et al. 2000). Bei Patienten mit Sepsis war die Expression des NOR ebenfalls signifikant verringert (Thompson et al. 2013). Es ist nicht davon auszugehen, dass in den oben genannten Publikationen solche gravierenden Erkrankungen bei den Probanden, deren Zellen untersucht wurden, vorhanden waren. Allerdings zeigen die beispielhaft genannten Studien, dass verschiedene Entzündungsvorgänge im Körper zur veränderten Expression der Rezeptoren führen können (Gunji et al. 2000; Thompson et al. 2013). Es ist durchaus denkbar, dass es weitere, bisher noch unbekannte, pathologische Mechanismen oder genetische Besonderheiten gibt, die die Ausprägung der Rezeptoren beeinflussen und somit einen Nachweis erschweren

bzw. verfälschen können. Dies könnte das Auftreten der unterschiedlichen Ergebnisse bei der Untersuchung der Rezeptorexpression erklären.

Zum Vergleich mit den PBMC untersuchten wir mehrere Darmzelllinien von Schwein und Mensch und konnten Gemeinsamkeiten in der mRNA-Expression für die verschiedenen Opioidrezeptoren innerhalb der jeweiligen Spezies feststellen. So fanden wir in der Zelllinie IPEC-J2 aus porcinen Jejunum, wie zuvor in den PBMC des Schweins, nur die mRNA für den DOR (siehe Kapitel 4.4.4). In den humanen Darmzelllinien HT-29 und Caco-2 war hingegen zusätzlich zur mRNA des DOR auch die für den MOR nachweisbar (siehe Kapitel 4.4.4), wie wir es bereits für die PBMC des Menschen beschrieben haben (siehe Kapitel 4.4.2). Auch hier waren die Banden für den DOR und den MOR in etwa gleich lang, die erwarteten Banden unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Länge. Auch hier ist demnach fraglich, ob die erhaltenen Banden spezifisch für den DOR und den MOR sind. Bei dieser Untersuchung unterschieden sich unsere Ergebnisse ebenfalls von denen in bereits publizierten Studien. So wurden in IPEC-J2-Zellen geringe Mengen an mRNA für MOR und DOR nachgewiesen (Brosnahan et al. 2014), wir fanden hingegen nur den DOR. In Caco-2 Zellen fand man mittels immunzytologischer und molekularbiologischer Analyse den MOR und den KOR ausgeprägt (Neudeck et al. 2002; Neudeck et al. 2003). Wir konnten den KOR nicht nachweisen, stattdessen fanden wir die mRNA für den DOR, die Neudeck et al. nicht nachweisen konnten. Für die Darmzelllinie HT-29 wurde immunhistochemisch nachgewiesen, dass diese Zellen zumindest den MOR exprimieren (Nylund et al. 2008).

Die untersuchte Zelllinie Caco-2 diente bereits in einigen Resorptionsstudien mit BCM als Modell für das Darmepithel des Menschen (Iwan et al. 2008; Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009a). Diese Studien zeigten, dass die Aufnahme von BCM-5 und -7 über den Monolayer der Zellen möglich ist, dass die Peptide jedoch innerhalb von 60 min, vorwiegend durch das Enzym DPPIV aus den Caco-2-Zellen, abgebaut werden (Iwan et al. 2008; Sienkiewicz-Szłapka et al. 2009a). Die Caco-2-Zelllinie wurde ursprünglich aus dem Kolonadenokarzinom eines Menschen isoliert und besitzt viele typische Eigenschaften normaler Enterozyten der Dünndarmschleimhaut des Menschen (Lacroix et al. 2017). Die IPEC-J2 Zelllinie wurde ursprünglich aus dem jejunalen Epithel eines neugeborenen Ferkels gewonnen (Berschneider 1989). Ihre Besonderheit ist demnach, dass sie ihren Ursprung nicht in einer tumorösen Veränderung hat und auch nicht transformiert wurde (Zakrzewski et al. 2013). Sie

bildet einen Monolayer, der viele Eigenschaften von humanem Darmepithel aufweist und kommt diesem in ihrer Physiologie näher als jede andere Zelllinie nicht-humanen Ursprungs (Vergauwen 2015). Die Zellen tragen beispielsweise Mikrovilli auf ihrer apikalen Seite und bilden untereinander Tight Junctions aus (Nossol et al. 2015). IPEC-J2-Zellen imitieren die Bedingungen *in vivo* besser als die Caco-2-Zellen, da sie weder tumorösen Ursprungs noch transformiert und damit primären Darmepithelzellen ähnlicher sind (Schierack et al. 2006; Geens et al. 2011). Diese Eigenschaften zeichnen die IPEC-J2-Zelllinie, unserer Meinung nach, als gutes Modell aus, um den Mechanismus und die Effizienz des Transportes von BCM-7 aus dem Darminhalt *in vitro* zu untersuchen. Unseres Wissens wurden noch keine Versuche zur Absorption von Beta-Casomorphinen mit der IPEC-J2 Zelllinie durchgeführt, weshalb wir dies für zukünftige Versuche planen. BCM-5 wird hauptsächlich über intrazelluläre Transzytose transportiert, wie in Versuchen mit Caco-2-Zellen gezeigt werden konnte (Vij et al. 2016). Der genaue Transportmechanismus für BCM-7 wurde hingegen noch nicht beschrieben (Summer et al. 2020) und ist demnach ein spannendes Forschungsobjekt im Hinblick auf die A1-A2-Milch-Thematik. Die Aufnahme des opioiden Peptids aus dem Darminhalt ist essentiell für die Entfaltung von Wirkungen im Körper und damit für die Gesundheit des Verbrauchers.

Ein weiteres interessantes Modell, um die Auswirkungen auf das Darmepithel, bzw. den Transport von Beta-Casomorphinen über die Darmbarriere noch näher am lebenden Organ zu untersuchen, stellen intestinale Organoide dar. Diese dreidimensionalen Strukturen lassen sich *in vitro* aus Stammzellen des intestinalen Kryptenepithels auf einer speziellen extrazellulären Matrix anzüchten (Sato et al. 2009). Die Stammzellen differenzieren zu einem Verbund verschiedener Zellen, wie z.B. Becherzellen, Paneth-Zellen und Epithelzellen und dieser funktioniert vergleichbar mit dem Darmepithel *in vivo* (Treveil et al. 2020). Wir versuchten im Verlauf der praktischen Phase dieser Arbeit Organoide aus isolierten Dünndarmkrypten des Schweins zu erzeugen. Dem leicht modifizierten Protokoll einer Arbeitsgruppe folgend, die bereits erfolgreich Organoide aus den Krypten des Darms von Schlachtrindern und -schweinen gezüchtet hatte (Derricott et al. 2018), funktionierte die Isolation der Krypten zunächst sehr gut. Allerdings entwickelten sich diese Krypten in unseren Kulturen trotz Kombination verschiedener Nährmedien und spezifischer Wachstumsfaktoren (u.a. Noggin, R-Spondin-1 und Wnt-3a) bislang

nicht weiter. Als extrazelluläre Matrix verwendeten wir Kollagen, anstelle des in den meisten Publikationen verwendeten Matrigels. Kollagen wurde allerdings für die Anzucht von intestinalen Organoiden humanen Ursprungs als ebenso geeignet beschrieben (Jabaji et al. 2014). Wir werden weiter an der Etablierung dieses spannenden Modells arbeiten, da es eine einzigartige Möglichkeit darstellt, die Wirkung von BCM-7 auf die Darmphysiologie realitätsnah *in vitro* zu erforschen. So könnte man neben der Resorption von BCM-7 z.B. auch den Einfluss auf die Bildung von Mucinen an porcinen Becherzellen im Epithelverbund der Organoide genauer untersuchen. BCM-7 verursachte in Versuchen mit Zelllinien wie HT-29 und am isolierten Rattendarm eine signifikante Steigerung der Mucinproduktion (Trompette et al. 2003; Zoghbi et al. 2006). Eine weitere Wirkung von BCM auf den Gastrointestinaltrakt ist die signifikante Verringerung der Darmmotilität, die u.a. durch Versuche am isolierten Ratten-Kolon festgestellt wurde (Dalziel et al. 2014). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die Wirkung auf den Schweinedarm, als sinnvollerer Modell für den Menschen, vergleichbar ist. Da die hemmende Wirkung von BCM-5, zumindest im Rattendarm über Opioidrezeptoren vermittelt wurde, wie die komplette Aufhebung des Effektes durch Naloxon im oben genannten Versuch zeigte (Dalziel et al. 2014), untersuchten wir das Ileum des Schweins zunächst auf die Expression des MOR. Eine amerikanische Arbeitsgruppe untersuchte den Dünndarm des Schweins bereits in diesem Zusammenhang und fand mittels Radioliganden-Bindungsassay heraus, dass der MOR vor allem in den basalen Anteilen der Zotten und Krypten des ilealen Epithels ausprägt wird (Quito et al. 1991). Später fanden sie auch den DOR in der Wand des porcinen Ileums, sowohl in den myenterischen Neuronen, als auch in den Muskelschichten (Brown et al. 1998). Vor allem die Ausprägung der Rezeptoren im enterischen Nervensystem (ENS) des Schweins wurde daraufhin genauer untersucht und es stellte sich heraus, dass der DOR in allen Nervenplexen des ENS, der KOR nur im myenterischen Plexus und der MOR gar nicht im ENS vorkommt (Poonyachoti et al. 2001; Poonyachoti et al. 2002). Das Vorhandensein der mRNA für alle drei Rezeptortypen im Gewebe der Peyer-Platten des Ileums wurde ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe gezeigt (Pampusch et al. 1998). Da für die Wirkung von BCM hauptsächlich der MOR relevant ist, untersuchten wir speziell die Ausprägung dieses Rezeptortyps im Ileum des Schweins. Wir konnten mittels immunhistochemischer Analyse die Existenz des MOR ebenfalls vorwiegend in den basalen Anteilen der Zotten und Krypten des

Ileums nachweisen (siehe Kapitel 4.7.2). Spezielles Augenmerk legten wir hierbei auf die Peyer-Platten des Ileums als immunologisches Organ, hier konnten wir allerdings keine Expression des MOR finden. Mittels PCR hatten wir in vorherigen Versuchen bereits isolierte Lymphozyten aus den Peyer-Platten untersucht und lediglich die mRNA für den DOR nachgewiesen (siehe Kapitel 4.4.3). Das Fehlen des MOR auf den gastrointestinalen Lymphozyten muss jedoch nicht bedeuten, dass BCM keinen Effekt auf die Funktion dieser Zellen ausüben kann. BCM könnte auch sekundär auf die Zellen wirken, indem es beispielsweise an Opioidrezeptoren auf den Zellen des ENS bindet und diese dadurch einen Effekt auf die Immunzellen ausüben. Dies könnte über die veränderte Sekretion von Zytokinen reguliert werden, wie sie schon für andere Zellen unter Einfluss von Opioiden nachgewiesen wurde. Man fand beispielsweise heraus, dass Monozyten unter Einfluss von endogenen Opioiden wie Enkephalin mehr IL-6 produzieren (Kamphuis et al. 1998). Andere Opioide wie Methadon, Oxycodon und Diamorphin hemmten wiederum die IL-6-Produktion humaner IL-2-stimulierter PBMC (Boland et al. 2014). Die Produktion von TNF- α durch LPS-stimulierte canine PBMC wurde durch Morphin, Buprenorphin und Fentanyl signifikant gesteigert (Declue et al. 2014). Außerdem könnte die Wirkung von BCM-7, wie bereits für die porcinen PBMC beschrieben, auch auf den Peyer-Platten-Lymphozyten über andere Rezeptoren wie z.B. den TLR-4 vermittelt werden. Zukünftig werden wir die Wirkung von BCM-7 auf die Lymphozyten aus den Peyer-Platten genauer untersuchen, da sie bei der Absorption von Stoffen aus dem Darminhalt potentiell als erste Zellen des Immunsystems mit dem Peptid in Kontakt kommen. Wenn BCM-7 die immunologische Funktion dieser Zellen beeinflusst, könnte dies Auswirkungen auf die lokale Immunfunktion im Darm haben. Diese schützt den Körper als erste Instanz vor Pathogenen aus Lebensmitteln und ist daher sehr bedeutsam (Jing et al. 2019).

Eine weitere wichtige immunologische Einrichtung sind die Lymphknoten, die beim Schwein im Vergleich zum Menschen eine inverse anatomische Struktur aufweisen (Bordet et al. 2019). Hier treten die afferenten Lymphgefäße am Hilus ein und ziehen ins Zentrum des Lymphknotens, während die efferenten Gefäße sich subkapsulär vereinigen und über die gesamte Fläche der Kapsel verteilt austreten (Bordet et al. 2019). Bei den meisten anderen Säugetieren, wie auch beim Menschen, treten die afferenten Gefäße über die Kapsel ein und das efferente Gefäß zieht durch den Hilus nach außen (Bordet et al. 2019). Trotz dieser anatomischen Besonderheit stellt das

Schwein bei der Untersuchung von immunologischen Funktionen ein besseres Modell für den Menschen dar, als z.B. die Maus, wie vergleichende Genomuntersuchungen speziell im Hinblick auf Gene für Proteine der angeborenen und erworbenen Immunantwort zeigten (Dawson et al. 2013). In den Lymphknoten findet bei Säugetieren die Vermehrung und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten nach Antigenkontakt statt (Itano et al. 2003; Moran et al. 2018). BCM-7 könnte auf diesen Differenzierungsprozess Einfluss nehmen, indem es über das Blut in die Lymphknoten transportiert wird und direkt an Opioidrezeptoren auf den Lymphozyten bindet. Es könnte seine Wirkung jedoch auch an Rezeptoren auf den umliegenden Zellen im Lymphknoten entfalten, die dann sekundär, z.B. über Sekretion verschiedener Zytokine, Einfluss auf die Differenzierung der Lymphozyten nehmen könnten. Aus diesem Grund interessierte uns, ob die Lymphknoten des Schweins Opioidrezeptoren ausprägen. Die Arbeitsgruppe, die den porcinen MOR als erste klonierte, untersuchte jeweils den inguinalen und den mesenterialen Lymphknoten von mehreren Schweinen (Pampusch et al. 1998). Sie fanden jedoch keinen Hinweis auf die Expression der mRNA des MOR (Pampusch et al. 1998). Allerdings konnten sie die mRNA für den KOR in beiden Lymphknoten aller untersuchten Tiere und die für den DOR in einigen der untersuchten Lymphknoten nachweisen (Pampusch et al. 1998). Weitere Studien zur Ausprägung der Rezeptoren im Lymphknoten des Schweins wurden laut aktueller Pubmed-Literaturrecherche (Stand: 22.01.2021) bislang nicht durchgeführt. Deswegen untersuchten wir den Leistenlymphknoten des Schweins immunhistochemisch auf die Expression des MOR. Wir konnten nachweisen, dass einige Zellen im parafollikulären Bereich den MOR exprimieren. Im Bereich des Lymphfollikels konnte der Rezeptor nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.7.3). Unser Ergebnis unterscheidet sich demnach von dem von Pampusch et al., die nur die mRNA für den DOR und den KOR nachweisen konnten, die für den MOR jedoch nicht (Pampusch et al. 1998). Das Ziel zukünftiger Versuche wird sein, die Zellen, die den MOR ausprägen genauer zu charakterisieren und zu erforschen welche Auswirkungen BCM-7 auf die Differenzierung der Lymphozyten des Schweins hat. Es wurde bereits gezeigt, dass Morphin die Differenzierung humaner T-Helferzellen (TH-Zellen) Naloxon-reversibel verändert (Mao et al. 2016). CD4-positive T-Zellen wurden mit PMA stimuliert und für vier Stunden zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen Morphin behandelt (Mao et al. 2016). Nachfolgende durchflusszytometrische

Messungen zeigten eine prozentuale Verminderung der TH1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Morphinzugabe sowie eine verringerte Konzentration der Zytokine, die diese Zellen produzieren (Mao et al. 2016). Diese Studie zeigte, dass Morphin die Differenzierung von T-Lymphozyten zu TH1-Zellen über Bindung an Opioidrezeptoren hemmt (Mao et al. 2016). BCM-7 könnte eine vergleichbare Wirkung auf die Differenzierung von T- oder auch von B-Lymphozyten haben, die es näher zu untersuchen gilt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse über das, bislang nicht untersuchte, Proliferationsverhalten porciner PBMC unter Einfluss von BCM-7 und verschiedenen selektiven Opioiden gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass die PBMC des Schweins, ähnlich wie die des Menschen in bereits publizierten Studien, auf die Zugabe von BCM-7 reagierten. Dies zeigte, dass das Schwein in diesem Zusammenhang ein gutes immunologisches Modell für den Menschen darstellt und für weitere Untersuchungen zur Wirkung von BCM-7 auf andere Funktionen des Immunsystems geeignet ist. Durch diese Untersuchungen konnten demnach wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie sich das opioide Peptid auf den Verbraucher auswirken könnte. Des Weiteren sind unsere Ergebnisse relevant im Hinblick auf das Schwein als Nutztier und dessen Gesundheit, sowohl aus wirtschaftlichen als auch aus Verbraucherschutzgründen. Wenn BCM-7 immunologische Funktionen des Schweins beeinträchtigt und so zu vermehrten Erkrankungen, v.a. im Ferkelalter, führt, könnte eine Diät ohne BCM-7 zu verringerten Tierverlusten und besserem Wachstum führen, was die Wirtschaftlichkeit der Schweinemast verbessern würde. Außerdem sind viele Pathogene des Schweins Zoonose-Erreger und so eine potentielle Gefährdung für den Verbraucher. Eine verbesserte Immunabwehr des Schweins während der Mast ist deswegen auch aus Gründen des Verbraucherschutzes von großer Bedeutung. Für zukünftige Untersuchungen war der Nachweis der Opioidrezeptoren auf den verwendeten Immunzellen eine wichtige Vorarbeit. Wir konnten zeigen, dass die porcinen PBMC die mRNA für den DOR exprimieren (siehe Kapitel 4.4.1) und immunzytologisch sowie mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse konnten wir auch den MOR nachweisen (siehe Kapitel 4.5.1 und 4.6). Die PBMC des Menschen wiesen ebenfalls die mRNA für den DOR und den MOR auf (siehe Kapitel 4.4.2). Damit ist eine wichtige Voraussetzung erfüllt, dass opioide Stoffe auf die PBMC des

Schweins eine ähnliche Wirkung entfalten können, wie auf die humanen Zellen. Die meisten Studien werden, aufgrund der einfacheren Handhabung, immer noch an Nagetieren wie Mäusen und Ratten durchgeführt, obwohl die Physiologie, sowie auch die Immunologie dieser Tiere sich deutlich von der des Menschen unterscheiden und das Schwein für viele Fragestellungen ein sinnvollerer Modell darstellt (Walters et al. 2012). Das konnten wir mit dieser Arbeit verdeutlichen und so den Weg für die zukünftige Forschung zur Wirkung von BCM-7 auf immunologische und gastrointestinale Funktionen des Schweins als Modell für den Menschen ebnen. Die interessante Frage, ob das opioide Peptid aus der Milch ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellt, bleibt bestehen und bedarf weiterer Erforschung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Beta-Casomorphin-7 ist ein opioides Peptid, das bei der enzymatischen Verdauung aus Milch freigesetzt wird. Durch einen mutationsbedingt veränderten Beta-Casein-Genotyp, wird es aus der sogenannten A1-Milch vermehrt freigesetzt. Aus der ursprünglichen A2-Milch entsteht dieses Peptid, aufgrund der stabileren Aminosäuresequenz des Beta-Caseins, nur in sehr geringem Maße. Die Frage, ob BCM-7 aus Kuhmilch negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Verbrauchers hat, ist von großem Interesse für die Wissenschaft und die öffentliche Gesundheit. Vor dem Hintergrund der bereits bekannten immunsuppressiven Wirkung von Opioiden wie z.B. Morphin, wurde auch die Wirkung von BCM-7 auf Immunzellen näher untersucht. Es bewirkte Veränderungen im Proliferationsverhalten verschiedener Immunzellen des Menschen.

Wir untersuchten in dieser Studie erstmals die Wirkung von BCM-7 auf die Proliferation von porcinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), da das Schwein aufgrund der ähnlichen Physiologie, Anatomie und Immunologie in vielen Bereichen der Medizin als gut geeignetes Tiermodell für den Menschen gilt. Außerdem interessierte uns die Wirkung von BCM-7 auf das Schwein als Nutztier, da eine Immunsupprimierung, vor allem in der Ferkelaufzucht, zu Wachstumseinbußen und höheren Tierverlusten führen kann. Zunächst untersuchten wir die Wirkung von A1- und A2-Milch vor und nach *in vitro* Verdau mit Pepsin, Pankreatin und Gallensäuren. Wir stellten fest, dass beide Milcharten unverdaut die Proliferation porciner PBMC hochsignifikant hemmten. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen der Wirkung von A1- und A2-Milch. Nach dem Verdau hemmten beide Milchsorten die Proliferation weiterhin signifikant, wenn auch weniger stark. Einen signifikanten Unterschied zwischen der Wirkung A1- und A2-Milch konnten wir jedoch auch nach der Verdauung nicht feststellen. Zur genaueren Untersuchung führten wir den Versuch mit reinem BCM-7 durch und konnten eine signifikante Hemmung feststellen, die sich durch den Opioidantagonisten Naloxon jedoch nicht antagonisieren ließ. Um näher zu charakterisieren, über welchen Mechanismus BCM-7 auf die porcinen Zellen wirkt, untersuchten wir diese im Rahmen dieser Arbeit auf die Ausprägung von Opioidrezeptoren. Wir fanden zunächst mittels molekularbiologischer Untersuchung nur die mRNA für den δ -Opioidrezeptor (DOR). Durch die Anwendung einer immunhistochemischen Färbung konnten wir auch den

μ -Opioidrezeptor (MOR) auf einer Subpopulation der PBMC darstellen. Eine genauere durchflusszytometrische Analyse brachte das Ergebnis, dass sowohl porcine T- als auch B-Zellen den MOR exprimieren. Beta-Casomorphine zeigten, in verschiedenen Studien, Wirkungen auf gastrointestinale Funktionen bei Nagetieren, z.B. auf die Darmmotorik und die Produktion von Mucinen. Es wäre interessant diese Wirkungen, speziell von BCM-7, zukünftig auch am Gastrointestinaltrakt des Schweins zu untersuchen. Als Vorarbeit für diese geplanten Versuche zur Wirkung von BCM-7 auf gastrointestinale und weitere immunologische Funktionen untersuchten wir das Ileum und die Lymphknoten des Schweins ebenfalls auf die Expression des MOR. Im Ileum fanden wir den Rezeptor mittels immunhistochemischer Analyse vermehrt in den basalen Anteilen der Zotten und Krypten, im Bereich der Peyer-Platten konnten wir hingegen keine Expression feststellen. Im Lymphknoten des Schweins fanden wir vor allem in den parafollikulären Bereichen eine Expression des MOR. Unsere Ergebnisse bilden in ihrer Gesamtheit eine gute Grundlage für die weitere Erforschung der Wirkung von BCM-7 auf gastrointestinale und immunologische Funktionen beim Schwein, sowohl als Nutztier, als auch als Modell für den Menschen. Diese Arbeit leistet somit einen ersten grundlegenden Beitrag zur Fragestellung, ob BCM-7 negative Auswirkungen auf das Immunsystem des Verbrauchers hat. Zukünftige Studien am Schwein im Rahmen dieses Projektes werden zur genaueren Aufklärung dieses interessanten Zusammenhangs führen.

7 SUMMARY

Beta-casomorphin 7 (BCM-7) is an opioid peptide that is released from milk during enzymatic digestion. Due to a mutation in the gene for beta-casein, it is formed from so-called A1-milk in higher amounts. During digestion of the primordial A2-milk-type this peptide is formed less frequently, because the amino acid sequence of A2-beta-casein is more stable against enzymatic digestion. The question if BCM-7 from cow's milk has adverse health effects on consumers is of great interest for scientists and a concern for public health. In light of the already known immunosuppressive effects of opioids such as morphine, the effect of BCM-7 on immune cells was studied. Results of these investigations showed, that BCM-7 altered the proliferation rate of various immune cells in humans.

In this study, we investigated for the first time the effect of BCM-7 on the proliferation of porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The pig is considered a well-suited animal model for humans in many fields of medicine due to its similar physiology, anatomy and immunologic function. We were also interested in the effect of BCM-7 on pigs as livestock, since immunosuppression, especially in piglet rearing, can lead to a reduced growth and higher animal losses.

First, we investigated the effect of A1 and A2 milk before and after *in vitro* digestion with pepsin, pancreatin and bile acids on the proliferation of porcine PBMC. We observed a highly significant inhibition of proliferation after addition of undigested milk from both types. There was no significant difference between inhibition with raw A1 and A2 milk. After *in vitro* digestion both milk types still significantly inhibited the proliferation compared to control, but to a lesser extent. There was still no difference between the effects of digested A1- and A2-milk. For further assessment we used pure, commercially available BCM-7 in the same assay and found a significantly inhibiting effect on the proliferation of porcine cells. This inhibition was not abolished with the opioid antagonist naloxone. To further characterize the mechanism by which BCM-7 acts on porcine cells, we examined them for opioid receptor expression. Initially, we only found the mRNA for the delta opioid receptor (DOR) using PCR analysis. By subsequent use of immunohistochemical staining, we were also able to visualize the μ -opioid receptor (MOR) on a subpopulation of porcine PBMC. Further analysis with flow cytometry yielded the result that both porcine T and B cells express the MOR.

In various studies, beta-casomorphines exhibited effects on gastrointestinal functions of rodents, such as reduced intestinal motility and increased production of mucins. It would be very interesting to study these effects on the gastrointestinal tract of pigs in the future. As preliminary work for these planned experiments, we examined the porcine ileum and lymph nodes for expression of MOR as well. In the ileum, we found increased expression of this receptor in the basal portions of villi and crypts by immunohistochemical analysis, whereas no expression was detected in the Peyer's patches. In the porcine lymph node we found expression of MOR mainly in the parafollicular areas. Taken together, our results build a good basis for further research on the effect of BCM-7 on gastrointestinal and immunological functions in pigs as livestock and as suitable model for humans. Thus, this thesis provides a first fundamental contribution to the question of whether BCM-7 has negative effects on the immune system of the consumer. Future studies in pigs within this project will lead to a more detailed elucidation of this interesting relationship.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agler, H. L., et al.
2005 G protein-gated inhibitory module of N-type Ca^{2+} channels. *Neuron* 46(6):891-904.
- Al-Hashimi, M., et al.
2016 Evidence for nociceptin/orphanin FQ (NOP) but not micro (MOP), delta (DOP) or kappa (KOP) opioid receptor mRNA in whole human blood. *British Journal of Anaesthesia* 116(3):423-29.
- Arévalo Sureda, E., et al.
2016 Maturation of the Intestinal Epithelial Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression. *PLoS One* 11(10):e0164775.
- Arisoy, S., and Ö Üstün-Ayten
2018 Hydrolysis of food-derived opioids by dipeptidyl peptidase IV from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Food Research International* 111:574-581.
- Asledottir, T., et al.
2017 Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 71:98-106.
- Asledottir, T., et al.
2018 Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 81:8-11.
- Asledottir, T., et al.
2019 Degradation of β -casomorphin-7 through in vitro gastrointestinal and jejunal brush border membrane digestion. *Journal of Dairy Science* 102(10):8622-8629.
- Azma, T., et al.
2018 Enhanced expression of gene coding for β -endorphin in human monocytic cells exposed to pulsed radio frequency electric fields through thermal and non-thermal effects. *Journal of Pain Research* 11:2887-2896.
- Barnett, M. P., et al.
2014 Dietary A1 beta-casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 beta-casein in Wistar rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65(6):720-7.
- Bayer, B. M., et al.
1990 Morphine inhibition of lymphocyte activity is mediated by an opioid dependent mechanism. *Neuropharmacology* 29(4):369-374.
- Beales, P., et al.
2002 A multi-centre, blinded international trial of the effect of A1 and A2 β -casein variants on diabetes incidence in two rodent models of spontaneous Type I diabetes. *Diabetologia* 45(9):1240-1246.
- Berscheider, H.M.
1989 Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl. *Gastroenterology* 96.
- Bian, T. H., X. F. Wang, and X. Y. Li
1995 Effects of morphine and naloxone on proliferation of lymphocytes in vitro. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 16(4):315-18.

- Blackwood, C. A., et al.
2019 Molecular Adaptations in the Rat Dorsal Striatum and Hippocampus Following Abstinence-Induced Incubation of Drug Seeking After Escalated Oxycodone Self-Administration. *Molecular neurobiology* 56(5):3603-3615.
- Boland, J. W., et al.
2014 A preliminary evaluation of the effects of opioids on innate and adaptive human in vitro immune function. *BMJ Supportive & Palliative Care* 4(4):357-67.
- Bordet, E., et al.
2019 Macrophage-B Cell Interactions in the Inverted Porcine Lymph Node and Their Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Frontiers in Immunology* 10:953.
- Borman, A., et al.
2009 Small doses of morphine can enhance NK cell cytotoxicity in pigs. *International Immunopharmacology* 9(3):277-83.
- Börner, C., and J. Kraus
2013 Inhibition of NF- κ B by opioids in T cells. *Journal of Immunology* 191(9):4640-7.
- Börner, C., et al.
2007 Comparative analysis of mu-opioid receptor expression in immune and neuronal cells. *Journal of Neuroimmunology* 188(1):56-63.
- Boutrou, R., et al.
2013 Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 97(6):1314-23.
- Brantl, V.
1984 Novel opioid peptides derived from human beta-casein: human beta-casomorphins. *European Journal of Pharmacology* 106(1):213-4.
- Brantl, V., et al.
1982 Antinociceptive potencies of β -casomorphin analogs as compared to their affinities towards μ and δ opiate receptor sites in brain and periphery. *Peptides* 3(5):793-797.
- Brantl, V., et al.
1981 Opioid activities of β -casomorphins. *Life Sciences* 28(17):1903-1909.
- Brantl, Victor, et al.
1979 Novel Opioid Peptides Derived from Casein (β -Casomorphins). I. Isolation from Bovine Casein Peptone. *Biological Chemistry* 360(2):1211.
- Brosnahan, A. J., et al.
2014 Morphine attenuates apically-directed cytokine secretion from intestinal epithelial cells in response to enteric pathogens. *Pathogens* 3(2):249-257.
- Brown, D. R., et al.
1998 Delta-Opioid Receptor mRNA Expression and Immunohistochemical Localization in Porcine Ileum. *Digestive Diseases and Sciences* 43(7):1402-1410.
- Brown, D. R., and J.-P. Timmermans
2004 Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility* 16(s1):50-54.
- Bryant, H. U., E. W. Bernton, and J. W. Holaday
1988 Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 245(3):913.

- Calise, S. J., et al.
2018 Immune Response-Dependent Assembly of IMP Dehydrogenase Filaments. *Frontiers in Immunology* 9:2789.
- Campana, G., et al.
2010 Long-term intrathecal morphine and bupivacaine upregulate MOR gene expression in lymphocytes. *International Immunopharmacology* 10(9):1149-1152.
- Caroli, A. M., et al.
2016 Detecting beta-Casein Variation in Bovine Milk. *Molecules* 21(2).
- Carvalho, E., et al.
2018 Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sciences* 207:152-157.
- Cass, H., et al.
2008 Absence of urinary opioid peptides in children with autism. *Archives of Disease in Childhood* 93(9):745-50.
- Cassell, R. J., et al.
2019 Rubiscolins are naturally occurring G protein-biased delta opioid receptor peptides. *European Neuropsychopharmacology* 29(3):450-456.
- Castillo-Umaña, M., et al.
2020 Milk production responses and rumen fermentation of dairy cows supplemented with summer brassicas. *Animal* 14(8):1684-1692.
- Cattaneo, S., et al.
2017 Protein breakdown and release of β -casomorphins during in vitro gastro-intestinal digestion of sterilised model systems of liquid infant formula. *Food Chemistry* 217:476-482.
- Celik, M. O., et al.
2016 Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca^{2+} -regulated release of opioid peptides. *Brain, Behavior, and Immunity* 57:227-242.
- Cerioti, G., et al.
2004 Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Journal of Dairy Science* 87(8):2606-13.
- Chakrabarti, S., et al.
2016 Chronic opioid treatment augments caveolin-1 scaffolding: relevance to stimulatory μ -opioid receptor adenylyl cyclase signaling. *Journal of Neurochemistry* 139(5):737-747.
- Chia, J. S. J., et al.
2018 Dietary Cows' Milk Protein A1 Beta-Casein Increases the Incidence of T1D in NOD Mice. *Nutrients* 10(9).
- Chin-Dusting, J., et al.
2006 Effect of dietary supplementation with β casein A1 or A2 on markers of disease development in individuals at high risk of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition* 95(1):136-144.
- Chuang, L. F., et al.
1995a Expression of Kappa Opioid Receptors in Human and Monkey Lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209(3):1003-1010.
- Chuang, L. F., et al.
1994 δ -Opioid Receptor Gene Expression in Lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202(3):1291-1299.
- Chuang, T. K., et al.

- 1995b Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216(3):922-30.
- Cieślińska, A., et al.
2012 Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63(4):426-430.
- Cordero, O. J., et al.
2015 CD26 Expression on T Helper Populations and sCD26 Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 10(7):e0131992.
- Dalziel, J. E., et al.
2014 An in vitro rat model of colonic motility to determine the effect of β -casomorphin-5 on propagating contractions. *Food & Function* 5(11):2768-2774.
- Dawson, H. D., et al.
2013 Structural and functional annotation of the porcine immunome. *BMC Genomics* 14.
- De Noni, I.
2008 Release of β -casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry* 110(4):897-903.
- De Noni, I., and S. Cattaneo
2010 Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry* 119(2):560-566.
- De Noni, I., M. Stuknytė, and S. Cattaneo
2015 Identification of β -casomorphins 3 to 7 in cheeses and in their in vitro gastrointestinal digestates. *Food Science and Technology* 63(1):550-555.
- Declue, A. E., et al.
2014 Effects of opioids on phagocytic function, oxidative burst capacity, cytokine production and apoptosis in canine leukocytes. *Veterinary Journal* 200(2):270-75.
- Defilippi, C., et al.
1995 Inhibition of small intestinal motility by casein: a role of beta casomorphins? *Nutrition* 11(6):751-54.
- Derricott, H., et al.
2018 Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell and Tissue Research* 375(2):409-424.
- Dettmer, K., et al.
2007 Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. *Analytical and bioanalytical Chemistry* 388(8):1643-1651.
- Dhawan, B. N., et al.
1996 International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological Reviews* 48(4):567-92.
- Divya, K., et al.
2020 Rapid detection of DPP-IV activity in porcine serum: A fluorospectrometric assay. *Analytical Biochemistry* 592:113557.
- Duarte-Vázquez, M. A., et al.
2017 Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition. *Foods* 6(7).

- Egger, L., et al.
2019 Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data. *Food Research International* 118:32-39.
- El-Rashidy, O., et al.
2017 Ketogenic diet versus gluten free casein free diet in autistic children: a case-control study. *Metabolic Brain Disease* 32(6):1935-1941.
- Elitsur, Y., and G.D. Luk
1991 Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clinical & experimental immunology* 85(3):493-497.
- Elliott, R. B., et al.
1999 Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42(3):292-296.
- Elwood, P. C., et al.
2004a Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke I. Evidence from the Caerphilly cohort. *European Journal of Clinical Nutrition* 58(5):711-717.
- Elwood, P. C., et al.
2004b Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke II. Evidence from cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition* 58(5):718-724.
- Elwood, P. C., et al.
2005 Milk consumption, stroke, and heart attack risk: evidence from the Caerphilly cohort of older men. *Journal of Epidemiology and Community Health* 59(6):502-505.
- Enjapoori, A. K., et al.
2019 In vivo endogenous proteolysis yielding beta-casein derived bioactive beta-casomorphin peptides in human breast milk for infant nutrition. *Nutrition* 57:259-267.
- Farrell, H. M., Jr., et al.
2004 Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87(6):1641-74.
- Farzi, A., et al.
2015 Toll-like receptor 4 contributes to the inhibitory effect of morphine on colonic motility in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 5:9499.
- Fiedorowicz, E., et al.
2011 The influence of mu-opioid receptor agonist and antagonist peptides on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Peptides* 32(4):707-712.
- Fox, P. D., and S. T. Hentges
2017 Differential Desensitization Observed at Multiple Effectors of Somatic μ -Opioid Receptors Underlies Sustained Agonist-Mediated Inhibition of Proopiomelanocortin Neuron Activity. *The Journal of Neuroscience* 37(36):8667-8677.
- Franchi, S., et al.
2019 Do All Opioid Drugs Share the Same Immunomodulatory Properties? A Review From Animal and Human Studies. *Frontiers in Immunology* 10:2914.
- Gallinat, J. L., et al.
2013 DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of Dairy Science* 96(1):699-709.
- Gaveriaux, C., et al.
1995 Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Letters* 369(2-3):272-76.

- Geens, M. M., and T. A. Niewold
2011 Optimizing culture conditions of a porcine epithelial cell line IPEC-J2 through a histological and physiological characterization. *Cytotechnology* 63(4):415-23.
- Gein, S. V., and S. G. Gileva
2012 β -endorphin regulation of lymphocyte proliferative response in men of different age groups. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR* 444:141-43.
- González-Domenech, P. J., et al.
2020 Influence of a Combined Gluten-Free and Casein-Free Diet on Behavior Disorders in Children and Adolescents Diagnosed with Autism Spectrum Disorder: A 12-Month Follow-Up Clinical Trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 50(3):935-948.
- Govitrapong, P., et al.
1998 Alterations of immune functions in heroin addicts and heroin withdrawal subjects. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286(2):883-89.
- Granier, S., et al.
2012 Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485(7398):400-404.
- Grinnell, S. G., et al.
2020 Synthesis and Characterization of Azido Aryl Analogs of IBNtxA for Radio-Photoaffinity Labeling Opioid Receptors in Cell Lines and in Mouse Brain. *Cellular and Molecular Neurobiology* 40(4).
- Groves, M. L.
1969 Some Minor Components of Casein and Other Phosphoproteins in Milk. A Review. *Journal of Dairy Science* 52(8):1155-1165.
- Gu, Y., et al.
2020 Association among cytokine profiles of innate and adaptive immune responses and clinical-virological features in untreated patients with chronic hepatitis B. *BMC Infectious Diseases* 20(1):509.
- Guantario, B., et al.
2020 A Comprehensive Evaluation of the Impact of Bovine Milk Containing Different Beta-Casein Profiles on Gut Health of Ageing Mice. *Nutrients* 12(7):2147.
- Gunji, N., et al.
2000 Expression of kappa-opioid receptor mRNA in human peripheral blood lymphocytes and the relationship between its expression and the inflammatory changes in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 19(3):95-100.
- Gustavsson, F., et al.
2014 Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 97(6):3866-77.
- Han, D., et al.
2013 Protective effect of β -casomorphin-7 on cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of hyperglycemia and oxidative stress. *Peptides* 44:120-126.
- He, M., et al.
2017 Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study. *Nutrition Journal* 16(1).

- Henschen, A., et al.
1979 Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 360(9):1217-24.
- Ho, S., et al.
2014 Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *European Journal Of Clinical Nutrition* 68:994-1000.
- Hohmann, L. G., et al.
2020 Comparative Effects of Milk Containing A1 versus A2 β -Casein on Health, Growth and β -Casomorphin-7 Level in Plasma of Neonatal Dairy Calves. *Animals (Basel)* 11(1).
- Houghtling, R. A., et al.
2000 Acute effects of morphine on blood lymphocyte proliferation and plasma IL-6 levels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917:771-77.
- Hsu, T., et al.
2019 Synthesis and pharmacological characterization of ethylenediamine synthetic opioids in human μ -opiate receptor 1 (OPRM1) expressing cells. *Pharmacology Research & Perspectives* 7(5):e00511.
- Huang, J., et al.
2014 RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *Journal of Immunology* 193(3):1496-503.
- Hunter, L. C., et al.
2003 Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Developmental Medicine and Child Neurology* 45(2):121-28.
- Hyman, S. L., et al.
2016 The Gluten-Free/Casein-Free Diet: A Double-Blind Challenge Trial in Children with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 46(1):205-220.
- Itano, A. A., and M. K. Jenkins
2003 Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology* 4(8):733-39.
- Iwan, M., et al.
2008 Transport of μ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides* 29(6):1042-1047.
- Jabaji, Z., et al.
2014 Type I collagen as an extracellular matrix for the in vitro growth of human small intestinal epithelium. *PloS one* 9(9):e107814.
- Jarmołowska, B., et al.
2019 Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients* 11(1):87.
- Jarmołowska, B., et al.
2007 Changes of beta-casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides* 28(10):1982-1986.
- Jarmołowska, B., et al.
2013 Glucose and calcium ions may modulate the efficiency of bovine β -casomorphin-7 permeability through a monolayer of Caco-2 cells. *Peptides* 49:59-67.
- Jianqin, S., et al.
2016 Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms

- of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition Journal* 15.
- Jing, Y., et al.
2019 4,4'-Diaponeurosporene-Producing *Bacillus subtilis* Promotes the Development of the Mucosal Immune System of the Piglet Gut. *Anatomical Record* 302(10):1800-1807.
- Jinsmaa, Y., and M. Yoshikawa
1999 Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides* 20(8):957-962.
- Kamiński, S., A. Cieślińska, and E. Kostyra
2007 Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics* 48(3):189-198.
- Kamphuis, S., et al.
1998 Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. *Journal of Neuroimmunology* 84(1):53-60.
- Kantonen, T., et al.
2020 Interindividual variability and lateralization of μ -opioid receptors in the human brain. *NeuroImage* 217:116922.
- Karagiannis, T. T., et al.
2020 Single cell transcriptomics reveals opioid usage evokes widespread suppression of antiviral gene program. *Nature Communications* 11(1):2611-2611.
- Kayser, H., and H. Meisel
1996 Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* 383(1-2):18-20.
- Knape, M. J., et al.
2020 Molecular Basis for Ser/Thr Specificity in PKA Signaling. *Cells* 9(6):1548.
- Koch, G., K. Wiedemann, and H. Teschemacher
1985 Opioid activities of human β -casomorphins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 331(4):351-354.
- Koch, G., et al.
1988 Human β -casomorphin-8 immunoreactive material in the plasma of women during pregnancy and after delivery. *Regulatory Peptides* 20(2):107-117.
- Koehl, A., et al.
2018 Structure of the μ -opioid receptor-G(i) protein complex. *Nature* 558(7711):547-552.
- Koivusaari, K., et al.
2020 Consumption of differently processed milk products in infancy and early childhood and the risk of islet autoimmunity. *British Journal of Nutrition* 124(2):173-180.
- Kosciuczuk, U., P. Knapp, and A. M. Lotowska-Cwiklewska
2020 Opioid-induced immunosuppression and carcinogenesis promotion theories create the newest trend in acute and chronic pain pharmacotherapy. *Clinics* 75:e1554-e1554.
- Kost, N. V., et al.
2009 Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides* 30(10):1854-1860.
- Kostraba, J. N., et al.

- 1993 Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. *Diabetes* 42(2):288-95.
- Kowalski, J.
1998 Immunomodulatory action of class mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in mice. *Neuropeptides* 32(4):301-306.
- Krishnamurti, C., and S. C. Rao
2016 The isolation of morphine by Serturmer. *Indian Journal of Anaesthesia* 60(11):861-862.
- Kulkarni-Narla, A., and D. R. Brown
2001 Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neuroscience Letters* 308(3):153-156.
- Kumar, S., et al.
2016 Discovery of inulin acetate as a novel immune-active polymer and vaccine adjuvant: synthesis, material characterization, and biological evaluation as a toll-like receptor-4 agonist. *Journal of Materials Chemistry* 4(48):7950-7960.
- Kurek, M., M. Czerwionka-Szaflarska, and G. Doroszewska
1995 Pseudoallergic skin reactions to opiate sequences of bovine casein in healthy children. *Rocz Akad Med Bialymst* 40(3):480-85.
- Kurek, M., et al.
1992 A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man. *International Archives of Allergy and Immunology* 97(2):115-20.
- Kusza, S., et al.
2016 Genetic polymorphism of CSN2 gene in Banat White and Carpatina goats. *Acta Biochimica Polonica* 63(3):577-80.
- Lacroix, I. M. E., et al.
2017 Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers. *Foods & Function* 8(2):701-709.
- Lamb, M. M., et al.
2015 The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatric Diabetes* 16(1):31-38.
- Lamers, D., et al.
2011 Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 60(7):1917-25.
- Laugesen, M., and R. Elliott
2003 Ischaemic heart disease, Type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *The New Zealand Medical Journal* 116(1168):U295.
- Listos, J., et al.
2019 The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 20(17):4302.
- Lopker, A., et al.
1980 Stereoselective muscarinic acetylcholine and opiate receptors in human phagocytic leukocytes. *Biochemical Pharmacology* 29(10):1361-5.
- Machelska, H., and M. O. Celik
2020 Opioid Receptors in Immune and Glial Cells-Implications for Pain Control. *Frontiers in Immunology* 11:300.
- Maher, D. P., D. Walia, and N. M. Heller

- 2019 Suppression of Human Natural Killer Cells by Different Classes of Opioids. *Anesthesia and Analgesia* 128(5):1013-1021.
- 2020 Morphine decreases the function of primary human natural killer cells by both TLR4 and opioid receptor signaling. *Brain, Behavior, and Immunity* 83:298-302.
- Mao, M., Y. Qian, and J. Sun
2016 Morphine Suppresses T helper Lymphocyte Differentiation to Th1 Type Through PI3K/AKT Pathway. *Inflammation* 39(2):813-21.
- Martucci, C., A. E. Panerai, and P. Sacerdote
2004 Chronic fentanyl or buprenorphine infusion in the mouse: similar analgesic profile but different effects on immune responses. *Pain* 110(1-2):385-92.
- Massella, E., et al.
2017 Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Italian Journal of Food Safety* 6(3):131-133.
- Maximyk, O., et al.
2015 Plasma membrane poration by opioid neuropeptides: a possible mechanism of pathological signal transduction. *Cell Death & Disease* 6(3):e1683.
- McCarthy, L., et al.
2001 Expression of functional μ -opioid receptors during T cell development. *Journal of Neuroimmunology* 114:173-80.
- McLachlan, C. N. S.
2001 β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses* 56(2):262-272.
- Mehrishi, J. N., and I. H. Mills
1983 Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. *Clinical Immunology and Immunopathology* 27(2):240-249.
- Meisel, H.
1986 Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *FEBS Letters* 196(2):223-227.
- Milan, A. M., et al.
2019 Comparison of the impact of bovine milk β -casein variants on digestive comfort in females self-reporting dairy intolerance: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 111(1):149-160.
- Miluchová, M., M. Gábor, and A. Trakovická
2014 Analysis of beta-casein gene (CSN2) polymorphism in different breeds of cattle. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 47(2):56-59.
- Minekus, M., et al.
2014 A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function* 5(6):1113-1124.
- Miyauchi, H., et al.
1997 Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. *Journal of Dairy Science* 80(10):2330-9.
- Mollereau, C., et al.
1994 ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters* 341(1):33-38.
- Moran, I., et al.

- 2018 Memory B cells are reactivated in subcapsular proliferative foci of lymph nodes. *Nature Communications* 9(1):3372.
- Muehlenkamp, M. R., and J. J. Warthesen
1996 β -Casomorphins: Analysis in Cheese and Susceptibility to Proteolytic Enzymes from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science* 79(1):20-26.
- Nelson, C. J., G. M. Schneider, and D. T. Lysle
2000 Involvement of Central μ - but Not δ - or κ -Opioid Receptors in Immunomodulation. *Brain, Behavior, and Immunity* 14(3):170-184.
- Neudeck, B. L., and J. M. Loeb
2002 Endomorphin-1 alters interleukin-8 secretion in Caco-2 cells via a receptor mediated process. *Immunology Letters* 84(3):217-221.
- Neudeck, B. L., J. M. Loeb, and J. Buck
2003 Activation of the κ -opioid receptor in Caco-2 cells decreases interleukin-8 secretion. *European Journal of Pharmacology* 467(1):81-84.
- Nguyen, D. D., et al.
2015 Identification and quantification of native beta-casomorphins in Australian milk by LC-MS/MS and LC-HRMS. *Journal of Food Composition and Analysis* 44:102-110.
- Nguyen, D. D., et al.
2018 Degradation of β -casomorphins and identification of degradation products during yoghurt processing using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Food Research International* 106:98-104.
- Nguyen, D. D., et al.
2014 Isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous identification and quantification of beta-casomorphin 5 and beta-casomorphin 7 in yoghurt. *Food Chemistry* 146:345-52.
- Nguyen, D. D., et al.
2019 Identification and quantification of beta-casomorphin peptides naturally yielded in raw milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *LWT-Food Science and Technology* 111:465-469.
- Nossol, C., et al.
2015 Comparing Two Intestinal Porcine Epithelial Cell Lines (IPECs): Morphological Differentiation, Function and Metabolism. *PLoS One* 10(7):e0132323.
- Novak, B., et al.
2018 Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells Are More Sensitive to Deoxynivalenol Than Those Derived from Poultry and Swine. *Toxins (Basel)* 10(4).
- Noviello, L., et al.
1997 Immunomodulatory responses to δ -opioid receptor ligands in human lymphocytes. *European Journal of Pharmacology* 332(2):R1-R2.
- Nylund, G., et al.
2008 Functional Expression of μ -Opioid Receptors in the Human Colon Cancer Cell Line, HT-29, and their Localization in Human Colon. *Digestive Diseases and Sciences* 53(2):461-466.
- Odunayo, A., et al.
2010 Immunomodulatory effects of opioids. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20(4):376-85.
- Otani, H., and I. Hata

- 1995 Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *Journal of Dairy Research* 62(2):339-348.
- Pal, S., et al.
2015 Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Nutrients* 7(9):7285-97.
- Pampusch, M. S., et al.
1998 Opioid receptor gene expression in the porcine immune system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 437:59-65.
- Poonyachoti, S., A. Kulkarni-Narla, and D. R. Brown
2002 Chemical coding of neurons expressing δ - and κ -opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cell and Tissue Research* 307(1):23-33.
- Poonyachoti, S., P. S. Portoghese, and D. R. Brown
2001 Characterization of opioid receptors modulating neurogenic contractions of circular muscle from porcine ileum and evidence that delta- and kappa-opioid receptors are coexpressed in myenteric neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297(1):69-77.
- Quito, F. L., V. S. Seybold, and D. R. Brown
1991 Opiate binding sites in mucosa of pig small intestine. *Life Sciences* 49(25):PL219-PL222.
- Rahim, R. T., et al.
2001 Administration of mu-, kappa- or delta-receptor agonists via osmotic minipumps suppresses murine splenic antibody responses. *International Immunopharmacology* 1(11):2001-2009.
- Raimondo, R. F. S., et al.
2019 The dynamics of individual whey protein concentrations in cows' mammary secretions during the colostral and early lactation periods. *The Journal of Dairy Research* 86(1):88-93.
- Rangel, A. H. N., et al.
2017 Polymorphism in the Beta Casein Gene and analysis of milk characteristics in Gir and Guzará dairy cattle. *Genetics and Molecular Research* 16(2).
- Read, L. C., et al.
1990 Absorption of beta-casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. *American Journal of Physiology* 259(3 Pt 1):G443-52.
- Reid, L. D., and C. L. Hubbell
1994 An assessment of the addiction potential of the opioid associated with milk. *Journal of Dairy Science* 77(3):672-75.
- Rothkötter, H. J.
2009 Anatomical particularities of the porcine immune system-a physician's view. *Developmental and Comparative Immunology* 33(3):267-72.
- Rüthrich, H. L., et al.
1992 Linear and cyclic beta-casomorphin analogues with high analgesic activity. *Peptides* 13(3):483-85.
- Sakurai, T., et al.
2018 Degradation of food-derived opioid peptides by bifidobacteria. *Beneficial Microbes* 9(4):675-682.
- Sanchón, J., et al.
2018 Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food Chemistry* 239:486-494.

- Sato, T., et al.
2009 Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262-266.
- Schierack, P., et al.
2006 Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and Cell Biology* 125(3):293-305.
- Sebastiani, C., et al.
2020 Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals (Basel)* 10(2):252.
- Sergeeva, M. G., Z. V. Grishina, and S. D. Varfolomeyev
1993 Morphine effect on proliferation of normal and tumor cells of immune origin. *Immunology Letters* 36(2):215-18.
- Shahabi, N. A., and B. M. Sharp
1995 Antiproliferative effects of delta opioids on highly purified CD4+ and CD8+ murine T cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 273(3):1105-1113.
- Sharma, S. K., W. A. Klee, and M. Nirenberg
1977 Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74(8):3365-9.
- Shi, M. M., et al.
2020 Hippocampal μ -opioid receptors on GABAergic neurons mediate stress-induced impairment of memory retrieval. *Molecular Psychiatry* 25(5):977-992.
- Sidor, K., et al.
2008 Content of beta-casomorphins in milk of women with a history of allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 19(7):587-91.
- Sienkiewicz-Szłapka, E., et al.
2009a Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal* 19(4):252-257.
- Sienkiewicz-Szłapka, E., et al.
2009b Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal* 19(4):258-263.
- Singh, A., et al.
2020 The protective effects of human milk derived peptides on the pancreatic islet biology. *Biology Open* 9(8):049304.
- Singh, M., et al.
1989 Plasma beta-Casomorphin-7 Immunoreactive Peptide Increases after Milk Intake in Newborn but not in Adult Dogs. *International Pediatric Research Foundation* 26 (1) 1989:34-38.
- Siqueiros-Cendón, T., et al.
2014 Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica* 35(5):557-566.
- Sokolov, O., et al.
2014 Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides* 56:68-71.
- Spahn, V., et al.
2018 Opioid receptor signaling, analgesic and side effects induced by a computationally designed pH-dependent agonist. *Scientific Reports* 8(1):8965.
- Summer, A., et al.

- 2020 Occurrence, biological properties and potential effects on human health of β -casomorphin 7: Current knowledge and concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*:1-19.
- Sun, Z., et al.
2003 Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides* 24(6):937-43.
- Sütas, Y., et al.
1996 Suppression of lymphocyte proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98(1):216-24.
- Şuteu, M., A. Vlaic, and S. V. Dărăban
2019 Characterization of a Novel Porcine CSN2 Polymorphism and Its Distribution in Five European Breeds. *Animals* 9(7):419.
- Svedberg, J., et al.
1985 Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6(5):825-830.
- Tailford, K. A., et al.
2003 A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis* 170(1):13-19.
- Taub, D. D., et al.
1991 Immunomodulatory activity of mu- and kappa-selective opioid agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(2):360.
- Thompson, A. A., et al.
2012 Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 485(7398):395-99.
- Thompson, J. P., et al.
2013 The Nociceptin/Orphanin FQ system is modulated in patients admitted to ICU with sepsis and after cardiopulmonary bypass. *PLoS One* 8(10):e76682.
- Toskulkao, T., et al.
2010 Alteration of lymphocyte opioid receptors in methadone maintenance subjects. *Neurochemistry International* 56(2):285-90.
- Treveil, A., et al.
2020 Regulatory network analysis of Paneth cell and goblet cell enriched gut organoids using transcriptomics approaches. *Molecular Omics* 16(1):39-58.
- Trompette, A., et al.
2003 Milk Bioactive Peptides and β -Casomorphins Induce Mucus Release in Rat Jejunum. *Journal of Nutrition* 133(11):3499-3503.
- Truswell, A. S.
2005 The A2 milk case: a critical review. *European Journal Of Clinical Nutrition* 59:623-631.
- Uddin, M. J., et al.
2012 Expression dynamics of Toll-like receptors mRNA and cytokines in porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147(3-4):211-22.
- Ul Haq, M. R., R. Kapila, and S. Kapila
2015 Release of β -casomorphin-7/5 during simulated gastrointestinal digestion of milk β -casein variants from Indian crossbred cattle (Karan Fries). *Food Chemistry* 168:70-79.

- Ul-Haq, M. R., R. Kapila, and V. Saliganti
2014a Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *Journal of Functional Foods* 8:150-160.
- Ul-Haq, M. R., et al.
2014b Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *European Journal of Nutrition* 53(4):1039-49.
- Umbach, M., et al.
1985 Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regulatory Peptides* 12(3):223-230.
- Valencia-Sánchez, L., et al.
2019 DPP-4 as a Possible Biomarker of Inflammation Before Abdominal Surgery for Chronic Pathology: Our Experience with Elective Cholecystectomy. *Medicina* 55(5):148.
- Vatzia, E., et al.
2019 Deoxynivalenol Affects Proliferation and Expression of Activation-Related Molecules in Major Porcine T-Cell Subsets. *Toxins (Basel)* 11(11).
- Venn, B. J., et al.
2006 A comparison of the effects of A1 and A2 beta-casein protein variants on blood cholesterol concentrations in New Zealand adults. *Atherosclerosis* 188(1):175-78.
- Vergauwen, H.
2015 The IPEC-J2 Cell Line. *In* The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, eds. Pp. 125-134. Cham (CH).
- Vij, R., et al.
2016 Transepithelial transport of milk derived bioactive peptide VLPVPQK. *Food Chemistry* 190:681-688.
- Walters, E. M., et al.
2012 Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Medical Genomics* 5:55.
- Wasilewska, J., et al.
2011 The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). *Neuropeptides* 45(3):189-95.
- Wick, M. J., et al.
1996 Differential expression of opioid receptor genes in human lymphoid cell lines and peripheral blood lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 64(1):29-36.
- Williams, J. P., et al.
2007 Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Express Nociceptin/Orphanin FQ, but Not μ , δ , or κ Opioid Receptors. *Anesthesia & Analgesia* 105(4):998-1005.
- Wu, H., et al.
2012 Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485(7398):327-32.
- Wybran, J., et al.

- 1979 Suggestive Evidence for Receptors for Morphine and Methionine-Enkephalin on Normal Human Blood T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 123(3):1068.
- Yadav, S., et al.
2020 Oral Feeding of Cow Milk Containing A1 Variant of β Casein Induces Pulmonary Inflammation in Male Balb/c Mice. *Scientific Reports* 10(1):8053.
- Yin, H., et al.
2012 β -Casomorphin-7 cause decreasing in oxidative stress and inhibiting NF- κ B-iNOS-NO signal pathway in pancreas of diabetes rats. *Journal of Food Science* 77(2):C278-82.
- Zakrzewski, S. S., et al.
2013 Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium. *PLoS One* 8(11):e79643.
- Zhang, L., et al.
2012 Regulation of mu opioid receptor expression in developing T cells. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 7(4):835-42.
- Zhang, W., et al.
2013 The protective effects of beta-casomorphin-7 against glucose -induced renal oxidative stress in vivo and vitro. *PLoS One* 8(5):e63472.
- Zhou, L., et al.
2015 Characterization of kappa opioid receptor mediated, dynorphin-stimulated [35S]GTP γ S binding in mouse striatum for the evaluation of selective KOR ligands in an endogenous setting. *Neuropharmacology* 99:131-41.
- Zoghbi, S., et al.
2006 beta-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290(6):G1105-13.
- Zong, Y. F., et al.
2007 Effects of intra-gastric beta-casomorphin-7 on somatostatin and gastrin gene expression in rat gastric mucosa. *World Journal of Gastroenterology* 13(14):2094-2099.

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg bedanken. Zunächst für die Aufnahme in ihre tolle Arbeitsgruppe und die Überlassung des spannenden und aktuellen Themas. Ihre gute Betreuung und ihre fachlich kompetenten Anregungen haben maßgeblich zur erfolgreichen Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Es ist absolut nicht selbstverständlich als Doktormutter immer ansprechbar zu sein und sich so viel Zeit für jeden einzelnen Doktoranden zu nehmen. Ich bin ihr sehr dankbar für dieses Engagement und vor allem auch für die außerordentlich schnelle Korrektur der Arbeit. Dankbar bin ich auch für die vielen schönen Ausflüge, die wir vor der Pandemie-Zeit mit der gesamten Arbeitsgruppe erleben durften.

Mein Dank gilt des Weiteren dem Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der LMU München unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka. Zum einen möchte ich mich für die Bereitstellung der Geräte und Materialien zur Untersuchung meiner Proben bedanken. Zum anderen gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer, der mir mit seinem außerordentlichen Wissen über Opioidrezeptoren zur Seite stand. Herrn Dr. Maximilian Mühlhaupt danke ich für die kompetente und geduldige Einführung in die Methodik der PCR. Und Frau Sarah Koutnik danke ich für die Untersuchung meiner Proben, als es mir aufgrund der Kontaktbeschränkungen wegen SARS-CoV-2 nicht möglich war, den Lehrstuhl zu betreten.

Dem Team vom Lehr- und Versuchsgut in Oberschleißheim möchte ich ganz herzlich danken für die bereitwillige Hilfe bei der Blut- und Milchprobenentnahme und die gute Kooperation, die nun schon etliche Jahre besteht. Ganz besonders Herrn Dr. Stefan Nüske danke ich dafür, dass er nie müde wurde uns die richtige Verwendung seiner Stauklemme am Rinderhals zu zeigen!

Ein ganz besonderer Dank geht außerdem an Sieglinde Hirmer, die definitiv die „gute Seele“ unserer Arbeitsgruppe ist. Mit deiner überaus geduldigen Art und deinem sonnigen Gemüt hast du mir bei allen erdenklichen Schwierigkeiten beigestanden.

Wenn ich an abenteuerlichen Methoden verzweifelt bin, die bislang hier noch niemand durchgeführt hat, warst du mir eine riesengroße Hilfe, vielen Dank dafür!

Bei Barbara Amann möchte ich mich für die unzähligen Stunden bedanken, die sie mit mir und für mich am Fluoreszenzmikroskop bzw. am PC verbracht hat. Auch unseren ehemaligen TAs Florian Gosselin und Claudia Guggenmos gebührt ein großes Dankeschön für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Bei meinen lieben Kollegen Claudia Barfüßer, Roxane Degroote, Anne Hoffmann, Kristina Kleinwort, Lucia Korbonits, Lea Lorenz, Marie Schillocks, Maggie Swadzba und Maria Weigand, sowie bei meinen mittlerweile leider schon ehemaligen Kollegen Isabella Giese, Bernhard Hobmaier und Carmen Wiedemann möchte ich mich aus vollem Herzen bedanken. Ihr habt die Zeit hier zu etwas ganz Besonderem gemacht und dafür gesorgt, dass ich jeden Tag gerne ans Institut gekommen bin. Ob wir nun miteinander Rinder gebändigt, Organteile auseinandergenommen und zu Zellmatsch verarbeitet oder FACS-Nachtschichten geschoben haben, es hat einfach echt Spaß gemacht mit euch!! Und vielen Dank an die ganze Arbeitsgruppe für das bereitwillige und fleißige Aufessen der geretteten Lebensmittel, die ich des Öfteren angeschleppt habe!

Dann möchte ich mich bei meinem damaligen Freund Marcel Hundscheid bedanken. Ohne die entspannenden Abende mit dir und deine Unterstützung wäre diese Zeit um einiges anstrengender gewesen!

Bei meiner gesamten Familie, insbesondere bei meiner lieben Oma Margot, möchte ich mich dafür bedanken, dass sie immer hinter mir stand und an mich geglaubt hat. Ein besonderer Dank gilt meiner kleinen Schwester Angelina. Du hast auch während der Schreibzeit nicht aufgegeben anzurufen, obwohl ich kaum Zeit hatte und echt schwer zu erreichen war. Die Telefonate haben sehr gutgetan! Und meinem Vater Matthias gebührt ein großes Dankschön für das tapfere Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich Dir, lieber Christian, dafür danken, dass du in den Wochen vor dem Rigorosum alles menschenmögliche getan hast um mir den Rücken frei zu halten, damit ich mich gut darauf vorbereiten konnte. Liebevoll hast du meine Stimmungsschwankungen ertragen und mich immer wieder aufgebaut. Ich liebe dich und freue mich wahnsinnig auf unseren gemeinsamen Neuanfang an den Alpen!